

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Recubrimientos activos procedentes de recursos infrautilizados y residuos de la industria para su aplicación en agroalimentación

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Mirari Yosune Arancibia Soria

Directoras

Elvira López Caballero
Pilar Montero García

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos



**Recubrimientos activos procedentes de recursos
infrautilizados y residuos de la industria para su
aplicación en agroalimentación**

TESIS DOCTORAL

Mirari Yosune Arancibia Soria

Madrid, 2014



**Departamento de Nutrición,
Bromatología y Tecnología
de los Alimentos**



**Instituto de Ciencia y Tecnología
de Alimentos y Nutrición**

RECUBRIMIENTOS ACTIVOS PROCEDENTES DE RECURSOS INFRAUTILIZADOS Y RESIDUOS DE LA INDUSTRIA PARA SU APLICACIÓN EN AGROALIMENTACIÓN

Memoria que presenta Mirari Yosune Arancibia Soria para optar al grado de Doctor

por la Universidad Complutense de Madrid

Bajo la dirección de la Dra. M. Elvira López Caballero y la Dra. M. Pilar Montero García,

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (ICTAN-CSIC)

La DOCTORA MARÍA ELVIRA LÓPEZ CABALLERO, Científico Titular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN (CSIC), y DOCTORA MARÍA PILAR MONTERO GARCÍA, Profesora de Investigación de Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN (CSIC),

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada ***Recubrimientos activos procedentes de recursos infrautilizados y residuos de la industria para su aplicación en agroalimentación***, presentada por **MIRARI YOSUNE ARANCIBIA SORIA** para optar al grado de **Doctor**, ha sido realizada en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC) bajo su dirección, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Madrid, a 03 de febrero de dos mil catorce.

Dra. M^a. Elvira López Caballero

Directora de la Tesis Doctoral

Dra. M^a. Pilar Montero García

Directora de la Tesis Doctoral

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA GRACIAS A LA FINANCIACIÓN DE DIFERENTES AYUDAS Y PROYECTOS:

- Programa de Becas del Gobierno Nacional de la República del Ecuador, Convocatoria Abierta 2010 para la Formación del Talento Humano a través de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología, SENESCYT, Ecuador.
- Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Proyecto AGL2008-00231/ALI, del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I). Ministerio de Economía y Competitividad, España.
- Programa CYTED. I+D Acción 309AC0382. Área 3.- Promoción del Desarrollo Industrial. Línea 3.5.- Recursos del agro: Obtención de materiales aditivos a partir de subproductos vegetales de la región y su aplicación en el desarrollo de envases biodegradables de uso agroalimentario y nutracéutico. Agrobioenvase. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

Índice

RESUMEN/ABSTRACT^[1]	1
I. INTRODUCCIÓN	11
IMPORTANCIA DEL APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DEL SECTOR AGROINDUSTRIAL	13
APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA ACUICULTURA	15
<i>Crustáceos</i>	17
<i>Algas</i>	24
APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS DE LA AGRICULTURA	26
<i>La soja</i>	27
ENVASES ALIMENTARIOS	35
<i>Envases biodegradables</i>	37
<i>Incorporación de compuestos bioactivos en los recubrimientos</i>	41
<i>Degradación</i>	44
II. HIPÓTESIS	49
III. OBJETIVOS	53
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL	57
V. MATERIALES Y MÉTODOS	61
OBTENCIÓN DE QUITOSANO, MÉTODO QUÍMICO	63
RECUPERACIÓN DE MATERIALES ACTIVOS	63
<i>Obtención de quitosano Ch40</i>	65
<i>Obtención de quitosano Ch10</i>	65
<i>Obtención de quitosano con enzimas de Colletotrichum lindemutianum y Mucor rouxii</i>	65
SOLUCIONES FILMOGÉNICAS DE QUITOSANO	66
PELÍCULAS	67
<i>Películas de quitosano</i>	67
<i>Películas de agar y de alginato</i>	67
<i>Películas de proteína de aislado de soja y lignina</i>	68

PROPIEDADES REOLÓGICAS Y VISCOSIDAD	69
<i>Viscosidad de las soluciones de quitosano</i>	69
<i>Propiedades viscoelásticas de las soluciones de quitosano</i>	69
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	70
<i>Contenido de agua</i>	70
<i>Determinación del pH</i>	70
<i>Actividad de agua</i>	70
<i>Contenido de cenizas</i>	70
<i>Contenido de minerales</i>	71
<i>Contenido de nitrógeno</i>	71
<i>TVB- N</i>	71
<i>Contenido de grasa</i>	71
<i>Contenido de glucosa y glicerol</i>	71
<i>Contenido de astaxantina</i>	72
<i>Composición de aminoácidos</i>	72
<i>Peso molecular viscosimétrico del quitosano</i>	73
<i>Solubilidad del quitosano</i>	73
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	73
<i>Grado de desacetilación</i>	73
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	74
<i>Capacidad de captura de radicales por ABTS</i>	74
<i>Poder reductor del hierro (FRAP)</i>	74
<i>Contenido de fenoles totales</i>	74
CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS.....	75
<i>Espesor</i>	75
<i>Microestructura</i>	75
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	75
<i>Propiedades mecánicas</i>	75
<i>Permeabilidad al vapor de agua</i>	76

<i>Solubilidad de las películas</i>	76
<i>Resistencia al agua</i>	76
<i>Color</i>	77
<i>Barrera a la luz y transparencia</i>	77
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	77
<i>Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco</i>	77
<i>Ensayos de conservación</i>	78
<i>Inoculación con Listeria monocytogenes</i>	79
ANÁLISIS SENSORIAL	79
EVALUACIÓN SENSORIAL.....	79
<i>Prueba triangular</i>	80
LIBERACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS	80
<i>Liberación en agua de cinamaldehído y eugenol</i>	80
<i>Liberación de citronelal y geraniol en espacio de cabeza</i>	81
BIODEGRADACIÓN.....	81
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	82
VI. TRABAJO EXPERIMENTAL	83
CAPÍTULO 1. EFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO EN LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y REOLÓGICAS DE PELÍCULAS DE QUITOSANO	
DE QUITOSANO	89
<i>Introducción</i>	91
<i>Materiales y Métodos</i>	92
<i>Resultados y discusión</i>	96
<i>Conclusiones</i>	108
<i>Bibliografía</i>	108
CAPÍTULO 2. SOLUCIONES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON MATERIALES	
ACTIVOS PROCEDENTES DE RESIDUOS DE LANGOSTINO (<i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i>).....	111
<i>Introducción</i>	113
<i>Materiales y métodos</i>	115

<i>Resultados y discusión</i>	120
<i>Conclusiones</i>	129
<i>Bibliografía</i>	129
CAPÍTULO 3. BIOTRANSFORMACIÓN DE QUITINA EN QUITOSANO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE ENZIMAS	
PROCEDENTES DE <i>COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM</i> Y <i>MUCOR ROXII</i>	133
<i>Introducción</i>	135
<i>Materiales y métodos</i>	136
<i>Resultados y discusión</i>	140
<i>Conclusiones</i>	144
<i>Bibliografía</i>	144
CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS DE QUITOSANO OBTENIDO POR UNA EXTRACCIÓN QUÍMICA SUAVE, CON LA INCORPORACIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO RECUPERADO A PARTIR DE RESIDUOS DE LANGOSTINOS	
<i>Introducción</i>	149
<i>Materiales y métodos</i>	151
<i>Resultados</i>	157
<i>Conclusiones</i>	168
<i>Bibliografía</i>	168
CAPÍTULO 5. COBERTURAS DE QUITOSANO ENRIQUECIDOS CON MATERIALES ACTIVOS DE RESIDUOS DE LANGOSTINO PARA LA CONSERVACIÓN DE LANGOSTINOS	
<i>Introducción</i>	175
<i>Materiales y métodos</i>	177
<i>Conclusiones</i>	189
<i>Bibliografía</i>	189
CAPÍTULO 6. LIBERACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CANELA DE MATRICES POLIMÉRICAS Y SU POTENCIAL APLICACIÓN DURANTE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LANGOSTINOS CRUDOS Y PELADOS	
<i>Introducción</i>	195
<i>Materiales y métodos</i>	197
<i>Resultados y discusión</i>	201
<i>Conclusiones</i>	207

<i>Bibliografía</i>	208
CAPÍTULO 7. PELÍCULAS BIODEGRADABLES CON ACEITE ESENCIAL DE CLAVO O CITRONELA FRENTE A LA MOSCA	
MEDITERRÁNEA DE LA FRUTA <i>CERATITIS CAPITATA</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE)	211
<i>Introducción</i>	213
<i>Materiales y métodos</i>	215
<i>Resultados</i>	217
<i>Discusión</i>	220
<i>Bibliografía</i>	222
CAPÍTULO 8. LIBERACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁILES Y BIODEGRADACIÓN DE PELÍCULAS ACTIVAS DE PROTEÍNA DE	
SOJA Y CON LIGNINA CON LA ADICIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CITRONELA	225
<i>Introducción</i>	227
<i>Materiales y métodos</i>	228
<i>Resultados</i>	234
<i>Conclusiones</i>	244
<i>Bibliografía</i>	244
VII. DISCUSIÓN GENERAL	249
VIII. CONCLUSIONES	325
<i>Conclusión general</i>	328
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	329
X. RESUMEN AMPLIADO^[2]	363
INTRODUCCIÓN	365
OBJETIVOS.....	366
RESULTADOS.....	367
<i>Recuperación de material activo a partir de residuos de langostino (<i>Litopenaeus vannamei</i>) y</i>	
<i>desarrollo de recubrimientos comestibles</i>	367
<i>Aplicación de coberturas en langostino</i>	370
<i>Desarrollo de películas bicapa con aceites esenciales en alimentos</i>	370

<i>Desarrollo películas bicapa con aceites esenciales para su aplicación en agronomía.....</i>	<i>372</i>
CONCLUSIONES	374
<i>Conclusión general.....</i>	<i>375</i>
APORTACIONES FUNDAMENTALES DE LA TESIS DOCTORAL.....	375
BIBLIOGRAFÍA.....	376
XI. EXTENDED ABSTRACT^[2]	379

Resumen/Abstract^[1]

[1] Este breve resumen es parte del cuerpo de la Tesis. El resumen ampliado se presenta al final del manuscrito, en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

[1] This short abstract is part of the main Thesis report. The extended abstract is included, at the end of the manuscript, in fulfillment of the directives of the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM.

Como alternativa al empleo de envases convencionales, en el presente trabajo se desarrollaron películas activas y biodegradables en base a materiales procedentes de recursos infrautilizados y residuos de la agroindustria, con el fin de cubrir necesidades específicas en el campo de la alimentación y la agricultura. Para ello se recuperaron biopolímeros y diversos materiales activos a partir de residuos de la industria de crustáceos (cefalotórax y cutícula de langostino *Litopenaeus. vannamei*): concentrados ricos en proteínas y lípidos, hidrolizados de naturaleza proteica, además de carotenoides. Inicialmente el material recuperado fue el quitosano y, considerando el impacto ambiental que supone la metodología tradicional de obtención, se desarrollaron diversos procesos mediante la modificación de tres factores. El primero consistió en la eliminación de la etapa de quitina. Los otros dos fueron el empleo de un agente reductor (NaBH_4) y el tiempo de desacetilación. De la combinación de estos factores se obtuvieron 8 quitosanos con diferente peso molecular y alto grado de desacetilación, cuyas propiedades filmogénicas y antimicrobianas resultaron efectivas y adecuadas para el desarrollo de recubrimientos. Sin embargo, este proceso impide la recuperación de material activo de naturaleza proteica o pigmentos.

Por esta razón, se planteó el aprovechamiento integral y más ecológico de los residuos de crustáceos utilizando métodos amigables con el medio ambiente. Este método consistió básicamente en una autólisis moderada, con la que se recuperaron compuestos de distinta naturaleza y actividad biológica: un extracto lipídico rico en carotenoides (especialmente astaxantina) y extractos ricos en proteína y lípidos, que por hidrólisis enzimática dieron lugar a hidrolizados proteicos y a una fracción sólida insoluble de material quitinoso. Este material, tras la desmineralización con ácido láctico, se sometió a una hidrólisis enzimática en dos etapas con un 99% de eficacia, en la que se recuperó un hidrolizado proteico y quitina. Posteriormente, la quitina se desacetiló mediante modificación al método tradicional, con objeto de reducir el empleo de álcali; durante esta etapa se disminuyó el empleo de NaOH en un 20% (10 M) y 80% en peso (2,5 M), obteniéndose quitosanos con grados de desacetilación de 84% y de 70%, respectivamente. La mayoría de los materiales recuperados, solos o en combinación con ambos quitosanos, presentaron excelentes propiedades antioxidantes y a su vez, algunos manifestaron actividad antimicrobiana, destacando en este sentido el quitosano con un GD de 70% (Ch10) y uno de los extractos lipoproteicos (PCc). En la búsqueda de un proceso de desacetilación más ecológico, esta etapa de desacetilación se realizó mediante un método biológico, con la aplicación de extractos crudos enzimáticos de quitina-desacetilasa obtenida a partir de los mohos *Mucor rouxii* y *Colletotrichum Lindemuthianum*. Sin embargo, la

desacetilación por este sistema continúa requiriendo el empleo de NaOH, por lo que no se consideró un método eficaz.

Con el material que presentó las mejores propiedades, PCc y Ch10, se desarrollaron recubrimientos. Las películas fueron resistentes y con buena barrera a la luz y como coberturas se adherían fácilmente, eran transparentes e inapreciables desde el punto de vista sensorial. Cuando se aplican sobre langostinos crudos durante su conservación en estado refrigerado, estos recubrimientos aumentaron la vida útil aproximadamente en 30%, retrasando además la aparición de melanosis.

Además se plantearon diversas estrategias para el desarrollo de películas con aceites esenciales, de manera que ejerzan su efecto antimicrobiano y antioxidante sin modificar las propiedades organolépticas de los alimentos. De este modo se evaluaron diversas matrices poliméricas, con reticulación mediante gelificación o sin entrecruzar para evaluar el poder de difusión, y métodos de incorporación de aceites esenciales en las películas. Se seleccionaron películas en bicapa con la incorporación del compuesto activo en la capa más externa, evitando así el contacto directo con el alimento. Las matrices objeto de estudio fueron alginato cálcico y agar, las cuales permitieron la liberación controlada en el tiempo de los compuestos bioactivos del AE, como el eugenol. Las películas en bicapa resultaron transparentes y estables y una vez aplicadas sobre langostinos inoculados con *L. monocytogenes*, redujeron a este patógeno en 3 ciclos logarítmicos durante la conservación. Por otro lado, el análisis sensorial de los productos recubiertos reveló que éstos no adquirieron sabor y olor característico del AE.

Las películas bicapa, elaboradas con materiales poliméricos naturales como la proteína de aislado de soja (SPI), entre otros, son biodegradables, lo que implica una ventaja sobre los plásticos tradicionales. Además, si el envase es activo (antimicrobiano o insecticida) y protege de la luz o el agua, se abre un abanico de posibilidades para su aplicación en agroalimentación. En este sentido se desarrollaron películas en bicapa en base a proteína de aislado de soja (SPI) reticulada, para conferir las propiedades de barrera al agua y se incorporó lignina, para proporcionar la barrera a la luz, además de sus conocidas propiedades antioxidantes. Se seleccionaron aceites esenciales con actividad insecticida y antimicrobiana como el clavo y la citronela. Estas películas presentaron propiedades insecticidas y efecto de fumigación frente a la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*, responsable del ataque de cultivos de gran repercusión económica. Durante el bioensayo, el AE de clavo produjo mayor mortalidad (~90%) en las moscas que el AE de citronela (~10%). En esta línea, y en un intento de simular las condiciones de utilización de los plásticos empleados para la protección de cultivos, se

seleccionó esta película para determinar su actividad en condiciones ambientales. Las películas permitieron la liberación de compuestos activos (citronelal y geraniol) en el tiempo, incluso después de seis meses de exposición a factores externos medioambientales como el agua, desecación, etc. Además presentaron actividad antimicrobiana frente al hongo *Fusarium oxysporum*, microorganismo responsable del “Mal de Panamá”. Al aplicar estas películas como recubrimientos de plátanos (*Musa acuminata* Colla AAA), se observó un descenso en la microbiota por efecto del tratamiento y no se modificaron las propiedades organolépticas. Posteriormente, durante un estudio de biodegradación, independientemente de las condiciones (ambientales o controladas) a las que se mantuvieron, las películas mostraron una pérdida de peso alrededor del 30% en un mes, lo que implica una rápida biodegradación en tan solo 30 días.

Las películas y coberturas desarrolladas en la presente Memoria presentan propiedades activas antioxidantes, antimicrobianas y/o insecticidas. Estos recubrimientos son biodegradables y susceptibles de aplicación incluso directamente sobre el producto, ya que no generan cambios en las propiedades sensoriales de los alimentos. Además, favorecen la conservación y no producen un impacto negativo en el medio ambiente.

As an alternative to the use of conventional packaging, active and biodegradable films and coatings were developed based on materials from underutilized resources and agro-waste, in order to cover specific needs in the Food and Agriculture fields. These biopolymers and active materials: concentrates enriched in protein and lipids, protein hydrolysates, as well as carotenoids were recovered from industrial crustacean waste (cephalotorax and cuticle of shrimp *Litopenaeus vannamei*). Initially chitosan was recovered and considering the environmental impact related to the traditional method of production, a process involving the elimination of the step chitin was developed. This new proposed method also protects the polymer chain degradation and oxidation during the deacetylation through the use of a reducing agent (NaBH_4). From the combination of these factors, 8 chitosans (T1-T8) were obtained. These chitosans had different molecular weights (Mw_v) and high degrees of deacetylation (DD), whose filmogenic and antimicrobial properties were effective and suitable for the development of films and coatings. However, the mentioned process prevents the recovery of active material (protein, pigments, etc.).

For this reason, a comprehensive utilization of shellfish waste using eco-friendly methods was developed. This method basically consisted of a moderate autolysis rendered some compounds of different nature and biological activity: lipid and carotenoids extract (particularly astaxanthin, CE) and an extract enrich in lipid and protein (PCc), which by enzymatic hydrolysis resulted in a protein hydrolyzate (HPC) and an insoluble solid fraction. This insoluble fraction occurred in a new concentrate also enriched in proteins and lipids (PCW) and chitinous material. The chitinous material, after demineralization with lactic acid, was subjected to an enzymatic hydrolysis (Viscozyme and Alcalase) in two stages with a 99 % efficiency, in which a protein hydrolyzate (HPch) and chitin were recovered. The chitin was deacetylated by modifying the method mentioned above; at this stage, the NaOH was reduced by 20% by weight and the obtained chitosan (CH40) showed a high DD (84%). Subsequently optimizing the deacetylation process, the consumption of NaOH was reduced by 80 % and rendered chitosan (Ch10) with a GD of 70%. Most of the recovered materials, alone or in combination with chitosan (CH40 or Ch10) showed excellent antioxidant properties, and in some cases showed antimicrobial activity too, especially Ch10 and PCc.

In the search for more environmentally friendly methods, the deacetylation process was performed using a biological method, with the application of a crude chitin deacetylase extract obtained from *Mucor rouxii* and *Colletotrichum lindemuthianum* molds. However, this system

still required deacetylation by the use of NaOH, and therefore is not considered an effective method.

With the material that provided the best active properties (PCc and Ch10), films and coatings were developed. The films were resistant and good light barrier and the coatings were easily adhered, transparent and could not be detected from a sensory standpoint, minimizing the characteristic astringency of chitosan. When applied to raw prawns during chilled storage, these coatings increased self-life by approximately 30% and further delayed the melanosis appearance too.

With the aim of avoiding the changes produced by essential oils (EO) in the food properties, some strategies to develop films with essential oils were explored. The objective was that the EO would exert their antimicrobial and antioxidant effect without modifying the organoleptic food properties. Thus, several polymer matrices were evaluated, with and without gelation, to evaluate the release of active compounds. Different methods to incorporate essential oils in the films, to maximize their active properties were also tested. Bilayer films were selected to include the active compound in the outermost layer, thus avoiding direct contact with food. Calcium alginate and agar were selected for matrixes, which allow the controlled release of bioactive compound from EO such as eugenol (antioxidant and antimicrobial compound) , which was released for at least 72 h, both at room temperature and under refrigeration. Bilayer films were transparent and stable, since the layers were not separated and maintained their integrity. These films, once applied on prawns inoculated with *Listeria monocytogenes*, were able to reduce this pathogen in 3 log units during chilled storage. Moreover, the sensory analysis of prawns and Nile perch, covered with bilayer films, revealed that these films protect the food from characteristic taste and odor of EO.

The bilayer films protect foods from sensory changes during the application of essential oils. In addition, films were developed with natural polymeric materials such as soy protein isolate (SPI), among others, are biodegradable, which implies an advantage over traditional plastics used for food packaging. If the films and coatings are active (antimicrobial or insecticidal) and protect from light or water, a wide range of possibilities opens for application in food and agriculture. Thus, bilayer films were developed. These films were based on crosslinked soy protein isolate (SPI) to impart water barrier properties, lignin was added to provide the barrier to light and antioxidant properties and essential oils were selected with insecticidal and antimicrobial activity, such as clove and citronella. These films showed insecticidal properties

and a fumigant effect against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*, responsible for attacking crops with great economic impact. During the bioassay, the clove EO produced higher mortality (~ 90%) in flies than citronella (~ 10 %).

In an attempt to simulate the conditions of the use of plastics bags for crop protection and to obtain an insect repellent effect, films based on crosslinked SPI-lignin-EO citronella were selected. Films allowed the release of active compounds (citronellal and geraniol), even after six months of exposure to external environmental factors such as water, drying, etc. Films showed antimicrobial activity against the fungus *Fusarium oxysporum*, responsible for "Panama disease ". Therefore, these films were used in a storage trial of bananas (*Musa acuminata* Colla). Results showed that a decrease in the total microbiota was recorded by the treatment. The use of these films did not produce changes in the organoleptic properties of the banana. During a biodegradation study, regardless of the storage conditions (ambient or controlled), the films showed a weight loss of about 30% in one month, which implies a potential and rapid biodegradation just in 30 days.

The films and coatings developed in the present work showed active antioxidant, anti-microbial and / or insecticidal properties. These films and coatings are biodegradable and capable of application directly to the product and they do not modify changes in the sensory properties of food. Moreover, they promote the sustainability as they do not produce a negative impact on the environment.

I. Introducción

Importancia del aprovechamiento de subproductos del sector agroindustrial

La Agroindustria involucra una serie de actividades mediante las cuales se obtienen y elaboran materias primas y productos intermedios derivados del sector agrícola así como la transformación de productos procedentes de la agricultura, la actividad forestal y la pesca (FAO, 1997). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1997), es evidente que una parte de la producción agrícola se somete a procesos de transformación entre la cosecha y la obtención del producto final. Una de las preocupaciones actuales es el aprovechamiento integral de los recursos agroindustriales y su manejo sostenible, que no solo abarca la explotación de los recursos sino también el mantenimiento de su potencial en el futuro y la utilización de subproductos y residuos generados. La producción agrícola infrautilizada constituye una potencial herramienta para aumentar la sostenibilidad de la agricultura a través de una reducción de los insumos teniendo en cuenta los efectos ambientales, contribuye en la mejora de la calidad de los alimentos y preserva la diversidad cultural y la dieta (Mayes *et al.*, 2011).

La Agroindustria puede tener también efectos colaterales perjudiciales para el medio ambiente. De hecho, puede ser una fuente importante de contaminación que en muchos casos genera un efecto acumulativo en el ecosistema. Con independencia de los problemas ambientales planteados, los productos infrautilizados, subproductos y residuos representan una cantidad considerable de material potencialmente reutilizable y una fuente importante de energía. El desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas contribuye en gran medida, no sólo la reducción de la emisión de residuos contaminantes sino a su utilización de forma rentable. De este modo gran parte de los residuos generados de la agroindustria podrían utilizarse como sustratos y nutrientes en una variedad de procesos microbianos/enzimáticos, mediante extracciones químicas más convencionales, etc., para dar lugar a productos con gran valor añadido (Kosseva, 2009) o incluso a co-productos. En la última década las industrias procesadoras y de envasado aúnan esfuerzos para reducir la cantidad de residuos y subproductos asociados con el consumo de alimentos. No obstante, en este sentido queda mucho por hacer ya que la cantidad de residuos orgánicos en los hogares continúa siendo muy elevada. Una forma de paliar este problema sería el envasado con sistemas de conservación que perduren en el tiempo y que se eliminen fácilmente.

La reciente conciencia ambiental ha contribuido al desarrollo de materiales de envasado o recubrimientos comestibles. Así se han obtenido con éxito películas y coberturas a partir de

diversos materiales considerados como subproductos o residuos, cuya gestión y eliminación además constituye un problema medio ambiental. A modo de ejemplo, las proteínas de suero de leche se utilizan para el desarrollo de películas biodegradables con buenas propiedades de barrera al agua (Mawson, 1994; Ramos, Fernandes, Silva, Pintado, y Malcata, 2012; Smithers, 2008). Este suero de leche constituye en algunos países un excedente muy utilizado como ingrediente alimentario, si bien en otros muchos es un residuo que constituye un verdadero problema ambiental. Otras fuentes de polímeros para la elaboración de películas y coberturas son las proteínas de gran calidad (ej. colágeno, gelatina, plasma, etc.) procedente de los residuos de mataderos (Gómez-Guillén *et al.*, 2009; Nuthong, Benjakul, y Prodpran, 2009; Sobral, Menegalli, Hubinger, y Roques, 2001), concentrados proteicos con un alto contenido residual en compuestos polifenólicos (ácidos clorogénico y cafeico) obtenidos como residuo de la industria aceitera (girasol) que poseen capacidad filmogénica (Salgado, López-Caballero, Gómez-Guillén, Mauri, y Montero, 2012; Salgado, Molina Ortiz, Petruccelli, y Mauri, 2010); el arabinoxilano (fibra) procedente de residuos de cereales (Zhang y Whistler, 2004) o el quitosano (residuo de la acuicultura), polímero utilizado en múltiples aplicaciones que por su capacidad filmogénica se utiliza en el desarrollo de películas y coberturas biodegradables con distinta actividad biológica (Aider, 2010).

La optimización y adecuación de las nuevas tecnologías para el procesado y aplicación integral de los residuos y productos infrautilizados de la agroindustria son aspectos muy interesantes pero de gran complejidad, ya que cada tipo de residuo requiere de métodos propios. La obtención de biopolímeros a través de procesos amigables con el ambiente y que no vayan en detrimento de la rentabilidad o de la calidad de los mismos es de gran importancia. También es necesario aprovechar las propiedades de los recursos infrautilizados y de los residuos y llevar a cabo un análisis exhaustivo de su capacidad como material filmogénico o como aditivo activo. Asimismo, es interesante mantener la premisa de que todos estos productos continúen siendo biodegradables. Por otro lado, conferir un valor agregado a estos materiales ofrece la ventaja de utilizar un residuo y/o aprovechar una materia prima poco explotada y, al mismo tiempo, producir recursos menos contaminantes que los materiales convencionales. Además se pueden obtener nuevos productos que sirvan como soporte a los compuestos bioactivos o nutraceuticos sin comprometer significativamente las propiedades de barrera y mecánicas, como lo son estas películas y coberturas. Todo ello constituye un valor añadido para los posibles usos comerciales, enfocado y dando respuesta a las necesidades de los usuarios finales. Los envases comestibles o de aplicación en agronomía con alta biodegradabilidad no solo deben ofrecer buenas características organolépticas, de manejo, con propiedades que

mejoren la conservación de alimento, etc., sino que tanto sus materias primas como el propio envase deben ser poco costosos para poder competir con los envases actuales de bajo precio en el mercado. En definitiva, estos nuevos envases o recubrimientos, o bien suponen una clara mejoría en la conservación del alimento o se trata de un producto atractivo tipo “*delicatessen*”, ya que de otro modo será muy difícil su implementación.

Aprovechamiento de subproductos de la acuicultura

Uno de los principales objetivos de la acuicultura, su razón de ser, es brindar condiciones en las que las especies marinas puedan prosperar. Las intervenciones en los ciclos de vida de los peces van desde la acuicultura extensiva (que implica la exclusión de depredadores y control de los competidores), a la acuicultura semi-intensiva (destinada a mejorar el suministro de alimentos) y finalmente a la acuicultura intensiva (destinada a proveer todos los requerimientos nutricionales de la población). La intensificación implica el incremento de la densidad de individuos, cambios en el hábitat y en las interacciones de la cadena alimentaria, lo que se traduce en una mayor utilización y gestión de los insumos y por ende una mayor generación de residuos. Los cambios en el hábitat ocasionan pérdidas en la productividad, en donde especies como los moluscos y arrecifes de coral son las más afectadas. La sobreexplotación generada por las piscifactorías afecta a los peces silvestres de la zona por la introducción de nuevas especies. También se reduce la fuente de alimentos y aumenta la contaminación biológica. Las enormes cantidades de caparazones de crustáceos se consideran un residuo de la industria y son eliminados para finalmente convertirse en un problema medioambiental y en una fuente potencial de propagación de agentes patógenos (Fig. 1) (Naylor *et al.*, 2000).

Los residuos y especies infrautilizadas de la industria pesquera (pescado, crustáceos, cefalópodos, moluscos, etc.) constituyen una gran fuente de minerales, proteínas y grasa. Los residuos comprenden en su mayoría cabezas, vísceras y cefalotórax y representan entre el 40-80% de la captura dependiendo de la especie (Khan y Nowsad, 2013). Su utilización representa un reto y una oportunidad, ya que muchos de ellos son una fuente de co-productos como colágeno, músculo, enzimas, quitina, condroitin o péptidos bioactivos (Kim y Mendis, 2006), que según el volumen de producción se destinan a un fin u otro (López-Caballero, Giménez, Gómez-Guillén, y Montero, 2013). Entre otras posibles aplicaciones, de estos residuos también se obtienen concentrados proteicos que, además de ingredientes tecnológicos, pueden ser bioactivos, cuyo destino podría ser el consumo humano (Pérez-Santín, Calvo, López-Caballero,

Montero, y Gómez-Guillén, 2013) o alimentación animal (Oliveira Cavalheiro, Oliveira de Souza, y Bora, 2007).

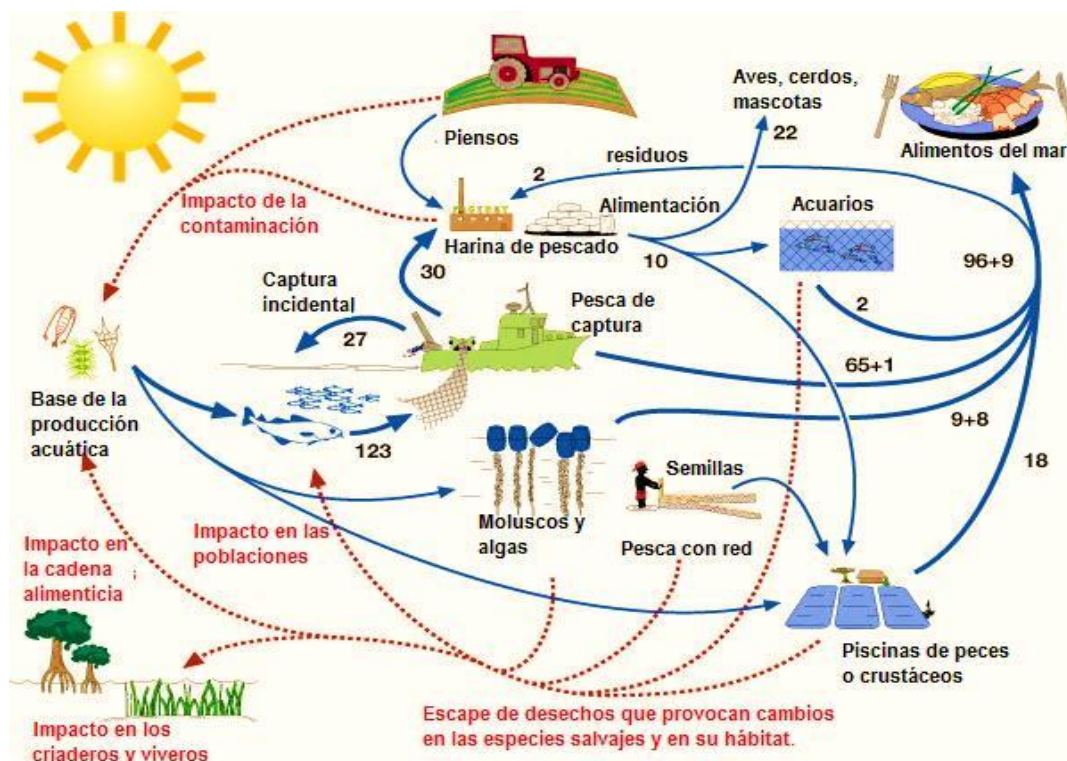


Figura 1. Vínculos ecológicos entre la pesca intensiva, la acuicultura y la pesca por captura. Trazos en azul (gruesos) se refieren a los flujos principales de la base de la producción acuícola a través de la pesca y la acuicultura para el consumo humano de productos del mar. Trazos en azul (delgados) se refieren a otros insumos necesarios para la producción. Trazos en rojo indican un impacto negativo. Los números representan megatonnes (millones de toneladas métricas) de peces, moluscos, peces y algas hasta 1997 (Naylor *et al.*, 2000).

Entre los recursos marinos, las algas son una fuente de material biológico renovable; constituyen un recurso abundante y a la vez infrautilizado, por lo que su aprovechamiento resulta de gran interés. En muchos países representan una fuente de riqueza con un verdadero potencial de explotación. Existen numerosas especies de algas que se utilizan hoy en día para la obtención de hidrocoloides, los cuales tienen múltiples aplicaciones. Muchos de estos biopolímeros son adecuados como matrices filmogénicas y han sido referidos en la literatura (López-Caballero *et al.*, 2013).

Crustáceos

En los últimos veinte años la industria de los crustáceos ha experimentado una expansión significativa, que en la actualidad se estima en un 9,6% de la producción acuícola mundial. En este sentido, el langostino, crustáceo decápodo nativo del Océano Pacífico y que en el continente americano habita desde México hasta Perú, sufre un incremento anual del 10,3% (FAO, 2012). En numerosos países, incluido España, se comercializa pelado; su transformación por tanto implica la eliminación de cabezas y caparazones, lo que representa una gran cantidad de residuos sólidos (40-50% del peso total). Estos residuos altamente perecederos son fuente de proteína (35-40%), quitina (10-15%), minerales (10-15%) y carotenoides (Sachindra, Bhaskar, y Mahendrakar, 2005) y a su vez producen una gran contaminación ambiental.

Carotenoides y caroteno-proteínas

Los carotenoides químicamente se clasifican como terpenoides; estos compuestos se consideran biosintéticamente derivados del ácido mevalónico y son los únicos tetraterpenoides conocidos (Moss y Weedon, 1976). Se sintetizan *de novo* por bacterias, mohos, levaduras, algas y vegetales y los animales superiores los ingieren con la dieta.

Se han descrito más de 700 carotenoides en la naturaleza. Los crustáceos contienen, entre otros, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno, astaxantina y cantaxantina, siendo estos dos últimos los mayoritarios (Mezzomo, Maestri, dos Santos, Maraschin, y Ferreira, 2011). Los carotenoides se encuentran normalmente formando fuertes asociaciones con proteínas y ácidos grasos. La astaxantina, además de a las proteínas (Findlay, Pappin, Brett, y Zagalsky, 1989; Milicua, Gómez, Gárate, y Macarulla, 1985; Yamada, Tanaka, Sameshima, e Ito, 1990) se encuentra unida a ácidos grasos en forma de mono o diésteres (Coral-Hinostroza y Bjerkeng, 2002; Matsuno e Hirao, 1989).

Los carotenoides son los responsables del color de los crustáceos, ya sea en forma libre, esterificada o formando un complejo con las proteínas. Los carotenoides tienen interés por su origen natural, alta versatilidad y no son tóxicos; son colorantes lipo-solubles (Fig. 2), algunos son provitamina A (si bien la astaxantina y cantaxantina no lo son) y debido a su capacidad antioxidante y otras propiedades pueden influir en la prevención de enfermedades como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otras. Por todo ello se ha descrito que los carotenoides pueden tener aplicaciones prometedoras a nivel industrial (Sánchez-Camargo, Martínez-Correa, Paviani, y Cabral, 2011; Sowmya y Sachindra, 2012). La extracción de las

caroteno-proteínas aumenta cuando el producto se somete previamente a un tratamiento térmico o una hidrólisis enzimática (Armenta-López, Guerrero, y Huerta, 2002). Sin embargo, cuando el carotenoide se encuentra unido a la proteína formando complejo caroteno-proteínas son hidrosolubles y confieren el color azul-verdoso característico a los crustáceos. Si un carotenoide se une a una lipoproteína de alta densidad también forman complejos estables (Lakshman y Okoh, 1993).

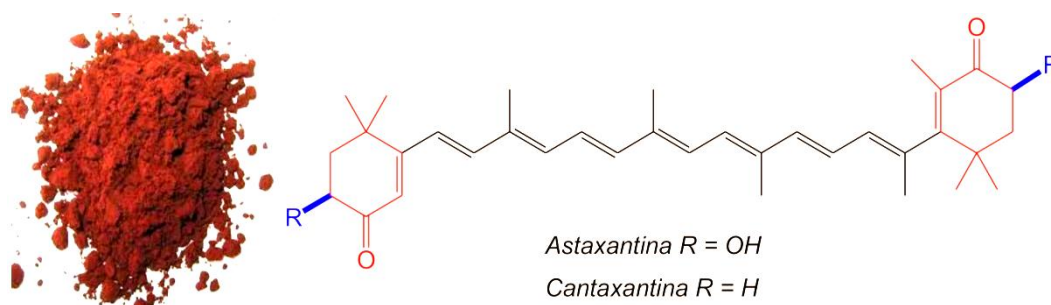


Figura 2. Esquema de la estructura de la astaxantina y la cantaxantina

Hidrolizados y concentrados proteicos

Los concentrados e hidrolizados proteicos han cobrado un gran protagonismo en los últimos años (Cancre *et al.*, 1999; De Holanda y Netto, 2006; Gildberg y Stenberg, 2001; Pérez-Santín *et al.*, 2013). La novedad en sí reside en la utilización de enzimas proteolíticas para hidrolizar los tejidos de los residuos de crustáceos. El objetivo es recuperar el material proteico junto con otros compuestos tales como lípidos, carotenoides, minerales, etc., para su máximo aprovechamiento mediante su extracción por fraccionamiento en distintos solventes y utilizando diferentes metodologías. Además del valor nutricional propio de cada compuesto, tras la hidrólisis se producen péptidos de diverso peso molecular que convierten a este concentrado en producto de alto valor en farmacología o en alimentación animal por su actividad biológica frente a enfermedades cardiovasculares, inflamación, cáncer o como estimulantes del crecimiento, entre otras (Kim *et al.*, 2006; Udenigwe y Aluko, 2012).

Quitina

La quitina es un polisacárido cristalino natural muy abundante (el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa) que constituye el material de soporte de crustáceos,

insectos, etc., (formando parte de su caparazón) y de la pared de algunos hongos, algas, etc. El caparazón de los crustáceos es una multifase biológica nanocompuesta que consiste en una matriz orgánica (quitina cristalina y proteínas no cristalinas) y biominerales (calcita, fosfato). Tanto la quitina como los biominerales forman parte de la matriz de quitina-proteína. Las subunidades más pequeñas en la jerarquía estructural de la cutícula son las macromoléculas de quitina.

En general la quitina consiste en unidades de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa unidas a través de un enlace β (1 \rightarrow 4). Es un material muy insoluble y de baja reactividad química y puede considerarse como una celulosa en la que el grupo hidroxilo en la posición C-2 se sustituye por un grupo acetamido (Fig. 3). La quitina es un material inelástico, polisacárido nitrogenado y es la principal fuente de contaminación de la superficie en las zonas costeras. La quitina se obtiene por tratamientos químicos o biológicos. Sin embargo, las preparaciones comerciales actuales de quitina utilizan tratamientos termoquímicos exhaustivos que involucran la desproteinización y desmineralización de residuos quitinosos procedentes del procesamiento de crustáceos (Focher, Beltrame, Naggi, y Torri, 1990; H. K. No y Meyers, 1995).

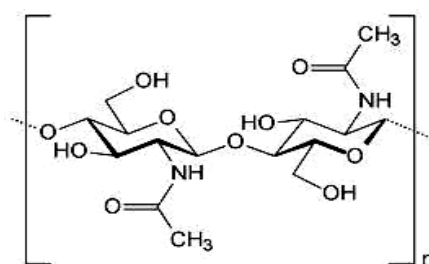


Figura 3. Estructura química de la quitina

La quitina se dispone en forma antiparalela formando cadenas de α -quitina, que prevalece en el exoesqueleto de los crustáceos; 18 a 25 de estas cadenas juntas forman nanofibras que se agrupan en largas cadenas de fibras de quitina-proteína con diámetros entre 50 y 350 nm. Las fibras se agrupan formando una especie de panal de abejas. Una característica de la cutícula de langosta es la presencia de un bien desarrollado sistema de cavidades que contienen alrededor las fibras de quitina-proteína dando la apariencia de un trenzado. Las partes duras de la langosta, la endo y exocutícula, se mineralizan con carbonato de calcio en forma de pequeños cristales de unos pocos nanómetros de diámetro (Chen, Lin, McKittrick, y Meyers, 2008; Raabe, Al-Sawalmih, Yi, y Fabritius, 2007) (Fig. 4).

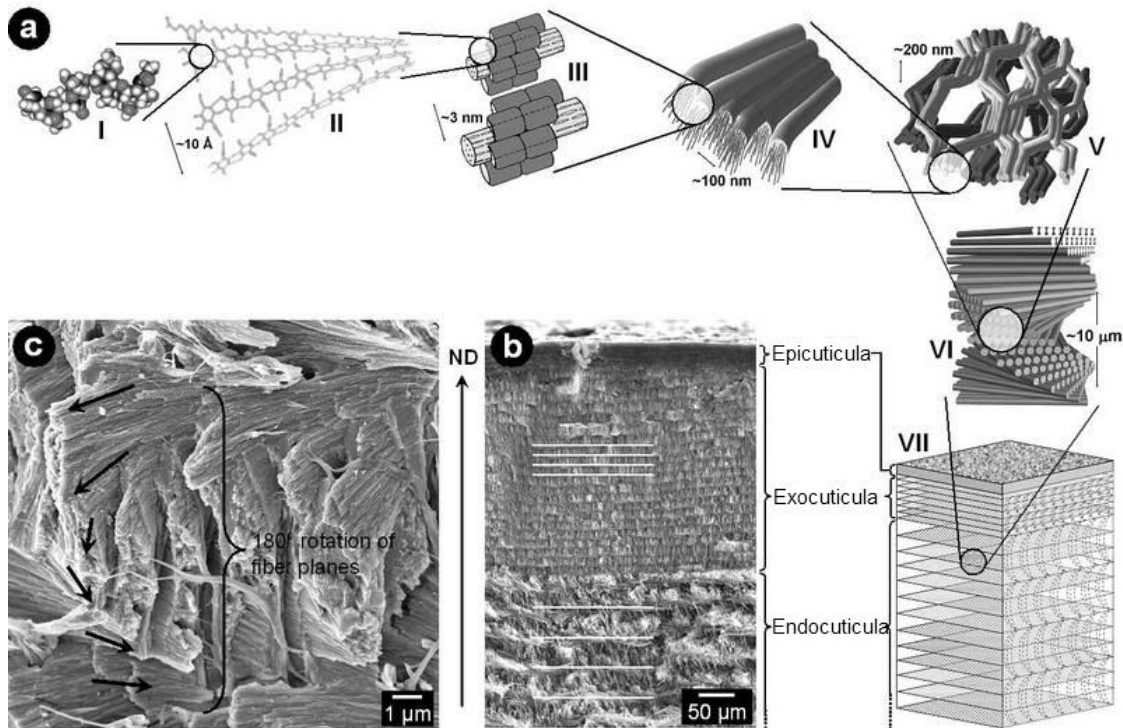


Figura 4. Microestructura de la cutícula de langosta americana *Homarus americanus* (a) organización jerárquica de partida con las moléculas acetilglucosamina (I) formando cadenas antiparalelas de α -quitina (II) dieciocho a 25 moléculas de quitina envueltas con las proteínas nanofibrilares naturales (III) formando fibras de quitina-proteína (IV) que están dispuestas en planos horizontales, donde los ejes longitudinales de las fibras están todas orientadas en la misma dirección alrededor de las cavidades del sistema de canales del poro (V). Las fibras de quitina-proteína forman la estructura de trenzado contrachapado típico (VI) de las tres capas de cutícula (VII). (b) micrografía SEM de una sección transversal a través de la cutícula que muestra epicutícula y la organización de la exo y endocutícula con diferentes apilamientos de las fibras de quitina-proteína (líneas blancas). (c) micrografía SEM transversal de la cutícula de langosta que muestra la rotación gradual de los planos de fibras alrededor del eje normal y los canales de poros entremezclados (Fabritius *et al.*, 2011).

La desproteínización envuelve un tratamiento alcalino para eliminar las proteínas, mientras que la desmineralización consiste en un tratamiento ácido para eliminar el carbonato de calcio. Estos procesos implican costes elevados especialmente en reactivos y desde el punto de vista ambiental por la disposición y gestión final de los residuos. La desmineralización generalmente se lleva a cabo con ácido clorhídrico, sulfúrico, acético o láctico. Una forma de reducir el gasto en reactivos es la producción *in situ* de ácido láctico a bajo coste a partir de sub-productos como el suero, lignocelulosa o almidón (Bautista *et al.*, 2001). El ácido láctico resulta más económico y amigable con el medio ambiente que los ácidos inorgánicos convencionales (ej. ácido clorhídrico y ácido sulfúrico). Durante la desproteínización, la degradación proteica con enzimas proteolíticas como la Alcalasa® es una alternativa comercial eficiente en sustitución al método tradicional con soluciones acuosas de NaOH, que además permite la recuperación de

la proteína bajo condiciones ecológicas (Bautista *et al.*, 2001; Valdez-Peña *et al.*, 2010). La recuperación de proteínas cuando se emplea NaOH requiere una etapa posterior de neutralización con ácidos inorgánicos que encarece el proceso, por lo que sería poco rentable.

Quitosano

El quitosano es un copolímero de bloque constituido por 2-amino-2-desoxi-D-glucosa (glucosamina) y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (D-glucosacetoamida) (Fig. 5). Se obtiene a partir de la eliminación de grupos acetilo de la quitina (desacetilación). Es un polisacárido biológicamente activo y por lo tanto valioso para numerosas aplicaciones.

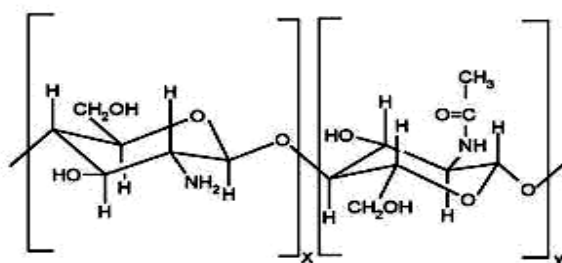


Figura 5. Estructura química del quitosano.

En contraste con la quitina, la presencia de grupos amino libres en el quitosano permite su disolución en medio ácido ($\text{pH} \leq 6,5$), lo que le confiere excelentes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y afinidad con otros polímeros. Se degrada por hidrólisis enzimática, lo que algunos autores relacionan con el grado de cristalinidad y que a su vez está controlado principalmente por el grado de desacetilación (Francis Suh y Matthew, 2000; Muzzarelli y Peter, 1997).

Obtención de quitosano

Como se menciona en el apartado anterior, el quitosano se obtiene por hidrólisis de los grupos acetilo de la quitina. Debido a la resistencia de algunos grupos acetilo en posición *trans* entre el C2 y C3, la desacetilación se lleva a cabo con un tratamiento alcalino prolongado y severo, que además requiere temperaturas superiores a los 100 °C y que son necesarias para conseguir la desacetilación parcial de la quitina (Kumar, 2000).

El proceso de desacetilación se ve afectado por la concentración de álcali, el tamaño de partícula y la densidad de la quitina. Estos dos últimos factores afectan la penetración del álcali en la zona amorfa y cristalina del polímero, por lo que generalmente se consiguen quitosanos con 75-80% de desacetilación. Durante el proceso de desacetilación se produce también la degradación de la cadena polimérica. Para disminuir la oxidación durante la desacetilación se emplean agentes reductores que además incrementan la viscosidad de las disoluciones ácidas de quitosano (Aranaz, Harris, y Heras, 2010). El grado de desacetilación es una de las características químicas más importantes del quitosano, ya que gobierna su potencial aplicación, toxicidad, solubilidad, contenido de grupos amino libres y permite diferenciarlo de la quitina (Guinesi y Cavalheiro, 2006).

La desacetilación además controla el peso molecular del quitosano, lo cual resulta difícil por el drástico proceso termoquímico que se lleva a cabo. Este hecho, a su vez, limita sus aplicaciones tecnológicas. Generalmente el quitosano de bajo peso molecular presenta mejores aplicaciones en genómica, específicamente con la transferencia de genes (Kim *et al.*, 2007). La industria alimentaria prefiere quitosanos con alto peso molecular que producen geles más viscosos y que son buenos como floculantes, estabilizantes, agentes filmogénicos, etc. (Mao *et al.*, 2004).

Durante la desacetilación se utilizan grandes volúmenes de soluciones de álcali altamente concentradas (Domard y Rinaudo, 1983; H. K. No, Meyers, y Lee, 1989). Si bien este proceso permite obtener un producto con un alto grado de desacetilación, compromete la calidad y genera la depolimerización de la cadena de quitina (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). Además, este tipo de procesos conlleva una serie de problemas ambientales por la gran cantidad final de residuos químicos generados (Synowiecki *et al.*, 2003).

Para contrarrestar este efecto, el empleo de enzimas durante la desacetilación de la quitina representa una alternativa interesante. La desacetilación enzimática es un proceso no degradativo, controlado y una solución bien definida al proceso termoquímico. La quitina-desacetilasa (CDA, EC 3.5.1.41) cataliza la desacetilación de las unidades de acetil glucosamina de la quitina a través de un mecanismo de múltiple ataque, lo que da como resultado un quitosano de buena calidad (Fig. 6) (Tsigos, Martinou, Kafetzopoulos, y Bouriotis, 2000; Yong Zhao, Park, y Muzzarelli, 2010). La enzima es poco efectiva sobre sustratos insolubles de quitina. La cristalinidad y la insolubilidad de la quitina son dos de las mayores barreras para una desacetilación enzimática efectiva. Estas características de la quitina hacen que deba ser pretratada a través de procesos físicos o químicos, para facilitar la accesibilidad de la enzima al

sustrato (Beaney, Gan, Magee, Healy, y Lizardi-Mendoza, 2007; Martinou, Kafetzopoulos, y Bouriotis, 1995).

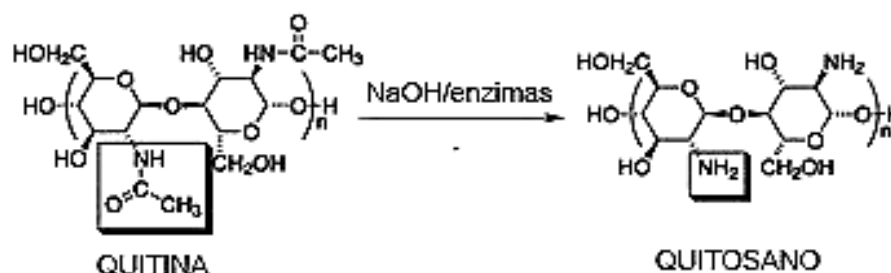


Figura 6. Conversión de quitina en quitosano.

El grado de desacetilación así como el peso molecular determinan las características fisicoquímicas del quitosano y sus posibles aplicaciones. Ambos son dependientes en gran medida de las condiciones utilizadas durante el proceso de producción (Rinaudo, 2006).

Aplicaciones del quitosano

El quitosano es un biopolímero de extraordinario potencial tanto a nivel fisiológico como tecnológico con múltiples aplicaciones en el campo de la alimentación, basadas en sus propiedades funcionales (Knorr, 1982; Kofuji *et al.*, 2005; Shepherd, Reader, y Falshaw, 1997). Entre ellas, desde el punto de vista tecnológico cabe destacar su poder antimicrobiano (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos, y Montero, 2005), de formación de películas protectoras (No, Meyers, Prinyawiwatukul, y Xu, 2007; López-Caballero *et al.*, 2013), como texturizante y ligante (López-Caballero *et al.*, 2005) y como antioxidante (Sun, Yao, Zhou, y Mao, 2008; Xing *et al.*, 2005), por lo que contribuye a aumentar la vida útil de los alimentos (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos, y Montero, 2005; López-Caballero *et al.*, 2005; No *et al.*, 2007).

Otras aplicaciones de interés del quitosano en el campo de la industria alimentaria son, por ejemplo, su uso en la purificación de aguas, inmovilización de enzimas y encapsulación de compuestos nutraceuticos (Shahidi y Abuzaytoun, 2005), etc. Desde el punto de vista fisiológico, el quitosano también tiene una gran importancia como reductor de la absorción intestinal de lípidos y por su comportamiento como fibra dietética, actuando como regulador de la motilidad del tránsito intestinal (Furda, 1983), y como agente hipocolesterolémico, por lo

que se utiliza como complemento dietético (Lee, Kim, y Kim, 1999; Sugano *et al.*, 1980). También tiene efecto sobre la coagulación de la sangre, restauración de lesiones, regeneración ósea, actividad inmune, etc., (Di Martino, Sittinger, y Risbud, 2005; Okamoto *et al.*, 2003). Basándose en estas últimas propiedades y en su poder filmogénico, recientemente algunos trabajos en investigación biomédica van encaminados al desarrollo de películas y otras estructuras para formar parte de prótesis, apósitos, etc.

Algas

Las algas y sus extractos crudos han sido explotadas desde la antigüedad como un vegetal más. La industria de las algas marinas ofrece en la actualidad una amplia variedad de productos cuyos beneficios se estiman entre 5500 y 6000 millones de dólares anuales (FAO, 2012). Los compuestos que se extraen de las algas forman parte de la industria de los hidrocoloides (McLachlan, 1985). Sin embargo, las algas también son fuente de material biológico de gran interés e importancia como son aminoácidos, vitaminas, minerales, etc., (Fleurence, 1999). La industria utiliza 7500-8000 millones de toneladas de algas húmedas al año procedentes del ambiente natural o cultivos (FAO, 2004).

Las especies botánicas de algas utilizadas como materia prima para la extracción comercial de gomas e hidrocoloides se clasifican en tres grupos basándose en su pigmentación: pardas, rojas y verdes, que reciben los nombres botánicos de feofíceas, rodofíceas y clorofíceas, respectivamente. Tanto el alginato como el agar son polisacáridos solubles en agua (hidrocoloides) producidos por varias especies de algas marinas, conocidos también como ficocoloides. Entre las más frecuentes destacan los reseñados en la (Tabla 1) (Glicksman, 1987).

Tabla. 1 Géneros de algas utilizados en procesos extractivos de alginato y agar.

Alginato	<i>Ascophyllum</i>
	<i>Durvillea</i>
	<i>Ecklonia</i>
	<i>Laminaria</i>
	<i>Lessonia</i>
	<i>Macrocystis</i>
	<i>Sargassum</i>
Agar	<i>Gelidium</i>
	<i>Gracilaria</i>
	<i>Pterocladia</i>

La principal característica de los ficoloides radica en sus propiedades gelificantes y estabilizantes. Tanto el agar como la carragenina y el alginato son polisacáridos complejos con innumerables posibilidades estructurales, físicas y aplicaciones específicas, tanto en la industria de alimentos como en la farmacéutica (McLachlan, 1985), por ejemplo como espesante de soluciones acuosas, en la formación de geles de distinto grado de firmeza (Glicksman, 1987), en películas biodegradables (Karbowski, Debeaufort, Champion, y Voilley, 2006; Phan, Debeaufort, Luu, y Voilley, 2005; Remunan-López y Bodmeier, 1997; Rhim, 2004), como estabilizante en alimentos (Doi, 1993), etc. Entre los hidrocoloides más utilizados, el alginato y agar son objeto de estudio más en detalle en la presente memoria.

Alginato

El alginato es un biopolímero lineal aniónico formado por unidades de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G). Estas dos unidades forman tres tipos de bloques: i) los bloques G (formados por unidades de ácido gulurónico), ii) los bloques M (formados por unidades de ácido manurónico) y iii) los bloques MG (formados por las unidades M y G alternadas, Campos-Vallette *et al.*, 2010). El alginato tiene numerosas aplicaciones industriales y médicas tanto por su biocompatibilidad, baja toxicidad y relativo bajo coste como por su capacidad de gelificación tras la adición de cationes divalentes como el Ca^{2+} para formar la estructura conocida como “caja de huevos” (Fig. 7). Los hidrogeles de alginato se pueden preparar por distintos métodos de entrecruzamiento lo que le confiere diversas propiedades fisicoquímicas y les dota de aptitud para una gran variedad de aplicaciones (Gombotz y Wee, 1998; Sun *et al.*, 2012).

Los geles de alginato pueden utilizarse como material de transporte para la liberación controlada de agentes bioactivos (por ejemplo, fármacos y proteínas), trasplante de células, apósitos para heridas, etc. Además, estos geles se pueden administrar o inyectar en el organismo de una manera no invasiva, lo que permite numerosas aplicaciones en el campo farmacéutico (Draget, Smidsrød, y Skjåk-Bræk, 2005; Eiselt, Yeh, Latvala, Shea, y Mooney, 2000; Lee y Mooney, 2012).

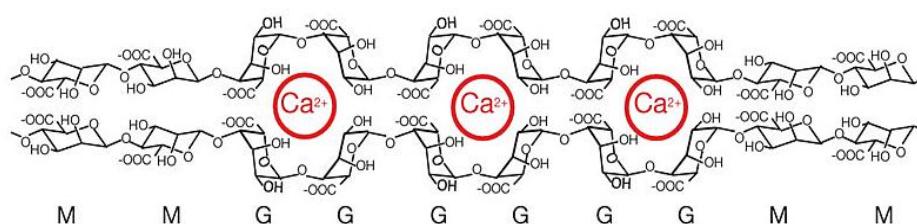


Figura 7. Entrecruzamiento de los bloques G del alginato con Ca^{2+} . Estructura “caja de huevos” (Sun *et al.*, 2012).

Agar

El agar se obtiene principalmente a partir de dos algas rojas: *Gelidium* sp., y *Gracilaria* sp., y está constituido por una mezcla heterogénea de dos clases de polisacáridos que tienen la misma estructura polimérica: agarosa, polímero neutro (fracción gelificante), y agarpectina, polímero sulfatado (fracción no-gelificante). La agarosa está constituida por unidades repetitivas del disacárido agarobiosa, cuya estructura es (1→4)-β-D-galactopiranos-(1→3)-α-3,6-anhidro-L-galactosa, con un peso aproximado de 120 kDa (d'Ayala, Malinconico, y Laurienzo, 2008; Phan, Debeaufort, Luu, y Voilley, 2005). Existe además el “agar-agar” que inicialmente está referido a los extractos de la especie *Eucheuma* (algas rojas), que principalmente son una fuente de carragenina. El agar es ampliamente conocido por su utilización en microbiología, ya que forma el material base para la preparación de medios de cultivo. También se utiliza como agente espesante, clarificante y laxante. Además de estos usos, más recientemente se ha empleado para desarrollar material de envasado como esponjas, películas y coberturas, que además tienen la particularidad de ser insolubles en agua y amigables con el ambiente (Freile-Pelegrín *et al.*, 2007; Lee, Lee, y Song, 1997). Por su gran versatilidad se utiliza también para mejorar las propiedades de barrera en combinación con otros polímeros como proteínas y almidones (F Debeaufort, Voilley, y Luu, 2009; Letendre, D'aprano, Lacroix, Salmieri, y St-Gelais, 2002; Phan *et al.*, 2005; Raphael, Avellaneda, Manzolli, y Pawlicka, 2010). Cuando forma parte de una película, su naturaleza no iónica le permite establecer una red que se estabiliza por enlaces de hidrógeno intermoleculares durante el secado (Nieto, 2009). Esta red actúa como soporte y permite la incorporación de compuestos activos o antimicrobianos para conferir estabilidad y alargar la vida útil de los alimentos (Geraldine, Soares, Botrel, y de Almeida Gonçalves, 2008).

Aprovechamiento de los recursos de la agricultura

A lo largo de los años, los cambios en el estilo de vida y el creciente comercio globalizado han favorecido el desarrollo de unos cuantos cultivos importantes que han llegado a dominar la producción, transformación y comercio agrícola a nivel nacional e internacional (Hawtin, 2007). Esta situación implica en ocasiones excedentes agrícolas y falta de aprovechamiento de recursos. La tendencia es que estas especies de plantas infrautilizadas tengan un papel relevante en el sustento y el bienestar humano y en la mejora de la salud y estabilidad de los ecosistemas.

Asimismo, la creciente preocupación por la contaminación y pérdida de biodiversidad centra la atención en el uso correcto de plaguicidas y herbicidas. Los países desarrollados imponen

restricciones a su utilización, pero aun así es necesario ahondar en la búsqueda de métodos ecológicos de control de plagas y evaluar la correlación entre los efectos adversos en el medio ambiente y el hombre.

La soja

La soja es un cultivo originario de China y fue introducido en Europa a principios del siglo XIX, si bien su producción a gran escala no se produjo hasta un siglo más tarde. Actualmente, Brasil es el líder mundial en la producción de soja seguido por Estados Unidos y Argentina, lo que hace que América del Sur sea el principal productor (Fig. 8). Se estima que la producción mundial de soja en 2013-2014 será 281,66 millones de toneladas (USDA, 2013).



Figura 8. Producción mundial de soja.

La soja, comúnmente llamada “cultivo milagroso”, es la principal fuente de proteína y aceite a nivel mundial. Es rica en proteínas y contienen fitoquímicos beneficiosos como las isoflavonas. La soja madura contiene aproximadamente el 38% de proteína, 30% de carbohidratos, 18% grasa, 14% de humedad y cenizas (Fig. 9) (Osborne, Mendel, Ferry, y Wakeman, 1917).

Parte de la producción de soja se destina al desarrollo de productos alimenticios como el tofu y el miso (Fukushima, 1981). Los residuos generados en esta etapa se utilizan en la elaboración de piensos para alimentación animal (Westendorf, 2000) y agentes texturizantes, como por ejemplo las fibras para aperitivos y bollería (Paiva, Barcelos, Pereira, Ferreira, y Ciabotti, 2012), hamburguesas vegetales, etc. La parte restante de la soja sirve para la obtención de aceite y

lecitina (Fig. 9), esta última como agente emulsionante muy utilizado en productos instantáneos (Rosenthal, Pyle, y Niranjana, 1996; Rydhag y Wilton, 1981). Al final del proceso se obtiene un producto esencialmente libre de grasa y con alto contenido en proteína conocido como “escamas de soja” (sin grasa). Estas escamas se muelen hasta obtener harina de soja, la cual se utiliza para la producción de piensos animales, principalmente aves de corral, cerdos, ganado y acuicultura. Además, estas escamas son la base de una variedad de productos como concentrados y aislados de soja (Rickert, Meyer, Hu, y Murphy, 2004; Wolf, 1970).

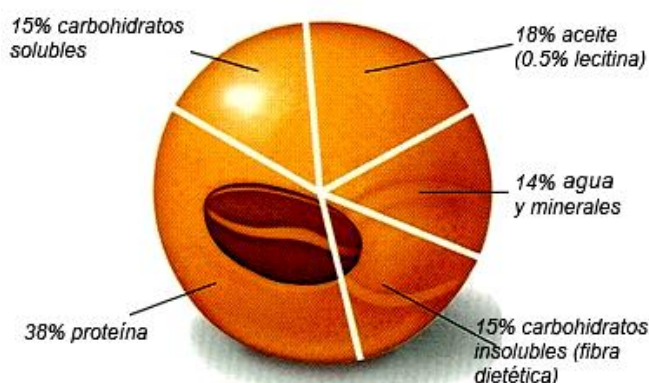


Figura 9. Composición química de la soja (WISHH, 2013).

Proteína de aislado de soja

Las proteínas de soja fueron los primeros biopolímeros de la agricultura utilizados para elaborar materiales moldeados. En efecto, la compañía de automóviles Ford en 1930 utilizó una mezcla fenol-formaldehído y harina de soja para desarrollar parte de estos materiales (Brother y McKinney, 1940), que posteriormente fueron reemplazados por los plásticos sintéticos. La proteína de soja presenta una serie de ventajas: está disponible en abundancia, su bajo coste y además proviene de recursos renovables (Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008). Como se mencionó anteriormente, de la soja se pueden obtener concentrados y proteína del aislado. La proteína de aislado de soja (*SPI*) contiene al menos un 90% de proteína. La presencia de grupos lipo e hidrofílicos en la misma cadena polimérica facilita la interacción de la proteína, tanto con materiales lipídicos como con el agua. La gran variedad de grupos funcionales en la cadena polimérica de la proteína como los grupos lipofílicos, polares (negativa y positivamente cargados) y apolares, permite que la proteína de soja se asocie con

diferentes tipos de compuestos. Las propiedades funcionales de la SPI dependen de la estructura molecular. Por ejemplo, la cohesividad, adhesividad, formación de fibras, solubilidad, capacidad de batido, poder emulsificante y formación de espuma son algunas de las propiedades que hacen de la soja un ingrediente funcional (McWatters y Cherry, 1977). Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de SPI se utiliza en la actualidad, por lo que representa un producto infrautilizado a pesar de su elevada calidad proteica, bajo coste y abundancia.

El uso de la proteína de soja en el desarrollo de películas y coberturas es una forma de aportar valor añadido a este material y aprovechar su potencial. La capacidad de formación de películas es una alternativa viable para producir envases comestibles respetuosos con el ambiente y biodegradables (Padgett, Han, y Dawson, 1998; Rhim, Gennadios, Handa, Weller, y Hanna, 2000). En general, las películas elaboradas a partir de SPI poseen una limitada resistencia al agua (como la mayoría de las proteínas). Alternativamente, se pueden considerar modificaciones químicas o la mezcla de proteína de soja con otros biopolímeros o su refuerzo con fibras naturales para desarrollar productos con buenas propiedades mecánicas y resistencia al agua (Bai, Xu, Liao, y Liu, 2013; Rhim *et al.*, 2000; Song, Zhou, Fu, Chen, y Wu, 2013).

Lignina

La lignina es un polímero aromático constituido por fenil-propano unido por enlaces carbono-carbono. Es el segundo polímero terrestre más abundante después de la celulosa y su compleja estructura lo hace único en la naturaleza. Su peso molecular oscila entre 1000-4500 Da y si bien su principal función está relacionada con proveer soporte a la pared celular de la planta, actualmente se ha planteado la hipótesis de que podría desempeñar un papel importante en la extensión de la pared celular de la misma (Lora y Glasser, 2002). En su estado natural, la lignina está íntimamente ligada a la celulosa y hemicelulosa (Fig. 10). La lignina se separa de la madera (como residuo) durante la fabricación de papel o por fraccionamiento de la biomasa, pero sin los actuales avances en la obtención de ligninas, éstas no serían químicamente homogéneas, limitando así sus posibles aplicaciones (Gardner, Generalla, Gunnells, y Wolcott, 1991). Anualmente se producen entre 40 y 50 millones de toneladas de lignina y se considera un residuo apenas comercializable o infrautilizado (Boudet, 2000; Lora *et al.*, 2002).

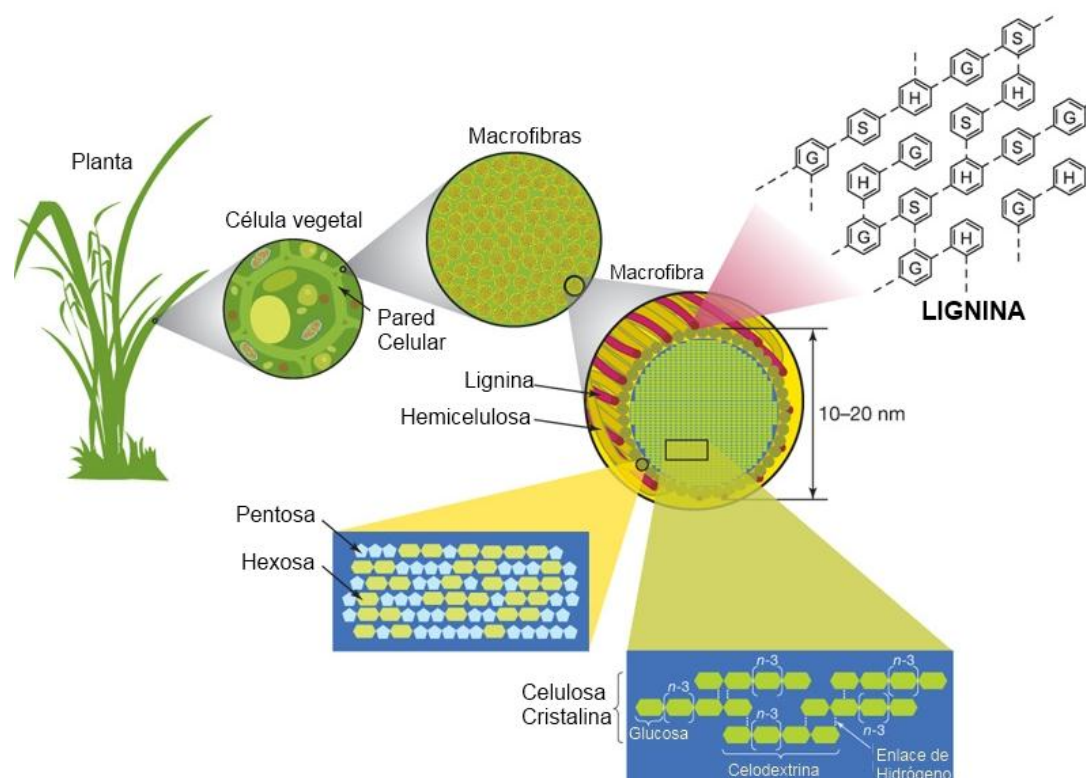


Figura 10. Estructura de la lignocelulosa. La resistencia a la degradación de la celulosa viene dada por las diferentes capas de polisacáridos. La hemicelulosa se compone de varios azúcares tales como arabinosa, galactosa, glucosa, manosa y xilosa. La lignina está formada por alcohol p-cumaril (H), alcohol coniferílico (G) y el alcohol sinapílico (S). En conjunto (celulosa, hemicelulosa y lignina) forman las macrofibras que aportan estabilidad a la pared de la célula vegetal de la planta (Rubin, 2008).

Como componente mayoritario de la fibra de la dieta, la lignina puede inhibir la actividad de algunas enzimas relacionadas con la generación de radicales superóxido e impedir el crecimiento y viabilidad de células cancerígenas (Lu, Chu, y Gau, 1998). La lignina es completamente biodegradable, si bien este proceso se realiza lentamente, por lo que puede emplearse para el diseño de polímeros potencialmente biodegradables (Vengal, 2005). Entre sus derivados, el lignosulfonato es una forma soluble de la lignina que contiene iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+}), grupos hidrofílicos (sulfónico, carboxilo, hidroxilo), y grupos hidrofóbicos aromáticos y alifáticos (Núñez-Flores *et al.*, 2012). En relación a sus aplicaciones actuales, la lignina es un candidato perfecto como sustituto parcial del fenol en las resinas fenol-formaldehído o tipo “resol” (Cetin y Özmen, 2002; Wang, Leitch, y Xu, 2009). Ello supondría, en principio, reducir el coste de fabricación de la resina y ampliar su campo de aplicación. El sector de los adhesivos es otro campo de aplicación de la lignina, que bajo una reacción con lacasas forma adhesivos con gran resistencia a la cizalladura comparables con la

fuerza de los adhesivos obtenidos a partir de urea-formaldehído (Stewart, 2008). La capacidad reticulante de la lignina hace que se incluya en resinas epóxicas, específicamente en aquellas de naturaleza fenol-epoxi (Zhao, Chen, Liu, Hu, y Wu, 2001).

Las poliolefinas (polímeros sintéticos derivados del petróleo), son un subsector en donde la lignina, en combinación con otros polímeros sintéticos, proporciona materiales con propiedades físico-mecánicas mejoradas (G Cazacu, Pascu, Profire, y Vasile, 2002; Georgeta Cazacu *et al.*, 2004). Un factor cada vez más importante que rodea a los plásticos en general, pero específicamente aquellos en base a poliolefinas, es su limitada o nula biodegradación. Sin embargo, este es un área de gran interés ya que algunos estudios revelan que al variar el porcentaje de incorporación de la lignina, el grado y la velocidad de biodegradación aumenta (Cazacu *et al.*, 2002; Lora *et al.*, 2002; Mikulášová, Košíková, Alexy, Kačík, y Urgelová, 2001).

Durante la última década, la lignina ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su carácter renovable, biodegradable y no tóxico (Bhat, Abdullah, Din, y Tay, 2013; Julinová *et al.*, 2010; Núñez-Flores *et al.*, 2013; Wu, Wang, Li, Li, y Wang, 2009). También se ha descrito a la lignina como un agente plastificante (Bouajila, Dole, Joly, y Limare, 2006), que por su naturaleza hidrofóbica reduce la absorción de agua y la transparencia en películas a base de almidón (Ban, Song, y Lucia, 2007) y gelatina (Núñez-Flores *et al.* 2013).

Debido a su compleja naturaleza polifenólica, la lignina y sus derivados pueden actuar como antioxidante a concentraciones que no son perjudiciales para las células humanas (Dizhbite, Telysheva, Jurkjane, y Viesturs, 2004; Núñez-Flores *et al.*, 2013; Vinardell, Ugartondo, y Mitjans, 2008) y como agente antimicrobiano (Dizhbite *et al.*, 2004), lo que abre la posibilidad de nuevas aplicaciones como en la formulación de biomateriales activos para el envasado de alimentos (Núñez-Flores *et al.*, 2013). Otros autores describen que la inclusión de lignina y derivados en películas a base de gelatina aumenta drásticamente las propiedades antioxidantes y en combinación con tratamientos de alta presión contribuyen a aumentar la vida útil de los productos pesqueros durante la conservación (Núñez-Flores *et al.*, 2013).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE), también denominados aceites volátiles o etéreos, comprenden una variedad de compuestos químicos que se agrupan básicamente en terpenos (mono y sesquiterpenos). Los terpenos, con más de 23000 compuestos conocidos, son el mayor grupo de sustancias naturales presentes de manera abundante en frutas, verduras, plantas aromáticas y medicinales; su función más importante es la protección de las plantas contra las infecciones, parásitos y otras condiciones de estrés (Bakkali, Averbeck, Averbeck, y Idaomar,

2008). Su aspecto es el de un líquido aceitoso aromático obtenido a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces) (Guenther y Althausen, 1952). Si bien los AE se obtienen también por expresión, fermentación o enflorado, la extracción por arrastre de vapor es el método más utilizado para su producción comercial (Vyas, 2013). Se estima que existen alrededor de 3000 AE conocidos, de los cuales unos trescientos son comercialmente importantes y están destinados principalmente a la industria de sabores y fragancias (Burt, 2004; Mendes *et al.*, 2010).

El interés por los aceites esenciales ha crecido en los últimos años tanto por sus propiedades biológicas como por el reciente interés de la población por el consumo de productos naturales, lo que ha dado lugar a un renovado interés científico por estas sustancias (Tiwari *et al.*, 2009). Además, la utilización de antioxidantes sintéticos se relaciona con alteraciones en el organismo (ej. carcinogénesis) por lo que su aplicación en alimentos ha sido restringida (Altmann, Grunow, Mohr, Richter-Reichhelm, y Wester, 1986). Entre sus numerosas propiedades, los AE y sus componentes han demostrado ser agentes efectivos con propiedades antioxidantes (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010; Sacchetti *et al.*, 2005), antibacterianas (Burt, 2004; Gómez-Estaca *et al.*, 2010; Janssen, Scheffer, y Svendsen, 1987; Knobloch, Pauli, Iberl, Weigand, y Weis, 1989; Smith-Palmer, Stewart, y Fyfe, 1998), antimicóticos (Daouk, Dagher, y Sattout, 1995; Knobloch *et al.*, 1989), antivirales (Bishop, 1995; Minami *et al.*, 2003; Sivropoulou *et al.*, 1997), antiparásitos (Lahlou y Berrada, 2003; Moon, Wilkinson, y Cavanagh, 2006) e insecticidas (Isman, 2000; Silva *et al.*, 2008; Specos *et al.*, 2010). Todas las propiedades de los aceites esenciales están íntimamente relacionadas con sus compuestos activos mayoritarios y con el modo en el que interactúan, si bien la presencia de algunos componentes minoritarios pueden contribuir de forma decisiva en las propiedades del aceite (Rota, Herrera, Martínez, Sotomayor, y Jordán, 2008).

La composición química de los aceites esenciales y sus propiedades en general se relacionan con dos tipos de configuración: la fenólica (ej. el eugenol o el cinamaldehído) y otra que involucra terpenos alifáticos hexavalentes (ej. el geraniol o el citronelal). Estos compuestos son mayoritarios en los aceites esenciales de canela, clavo (variedad también denominada “clavo de olor”) y citronela, que serán objeto de estudio en la presente memoria.

Aceite esencial de canela

La canela pertenece a la familia *Lauraceae* y se considera una medicina herbal tradicional. Se distribuye ampliamente en el este asiático, siendo China el mayor productor de canela en el mundo (Dornier, Lallemand, Pirot, y Reynes, 2000). El aceite esencial es un componente

importante de la corteza de la planta y contiene gran cantidad de terpenos y compuestos aromáticos, específicamente cinamaldehído (Fig. 11A). El aceite esencial de canela posee una excelente actividad anti-inflamatoria (Chao *et al.*, 2005), antioxidante (Mancini-Filho, Van-Koij, Mancini, Cozzolino, y Torres, 1998; Murcia *et al.*, 2004), anticancerígena (Schoene, Kelly, Polansky, y Anderson, 2005; Shan, Cai, Brooks, y Corke, 2009) y antibacteriana (Chang, Chen, y Chang, 2001). En la actualidad, este aceite se utiliza en la industria química, farmacéutica y cosmética; también se emplea en condimentos, alimentos y bebidas y como base para esencias, y se ha convertido en uno de los recursos naturales más importantes procedentes de las plantas, con un valor económico significativo (Li, Kong, y Wu, 2013).

Aceite esencial de clavo

El aceite esencial de clavo se obtiene a partir de los brotes de *Eugenia caryophyllata* y es muy utilizado y ampliamente conocido por sus propiedades medicinales. Tradicionalmente, los usos de aceite esencial incluyen, entre otros, el cuidado dental (como antiséptico y analgésico) por su actividad frente a las bacterias orales asociadas con la caries dental y la enfermedad periodontal (Cai y Wu, 1996). El componente principal del aceite esencial de clavo es el eugenol (Fig. 11B), seguido de β -cariofileno y en menor proporción otros componentes tales como alcohol bencílico, si bien las proporciones pueden variar.

Aceite esencial de citronela

El aceite esencial de citronela se obtiene a partir de la especie *Cymbopogon nardus* y contiene alrededor de 80 compuestos, la mayoría de los cuales corresponden al grupo de los terpenoides, especialmente geraniol (20-23%), así como otros alcoholes y aldehídos por ejemplo el citronelol (6-11%) y citronelal (6-35%). Entre sus propiedades se ha descrito la capacidad para elevar el estado de ánimo (antidepresivo), desodorizante, desinfectante e insecticida (en concentraciones de 0,05-15% p/v), solo o en combinación con otros productos naturales o sintéticos repelentes de insectos (Fradin, 1998). Al parecer esta actividad insecticida se debe principalmente al geraniol y al citronelal (Fig. 11C), que protegen frente a los mosquitos y además presentan bajos niveles de toxicidad para el hombre y animales (Kim *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008; Trongtokit, Rongsriyam, Komalamisra, y Apiwathnasorn, 2005; Yang y Ma, 2005).

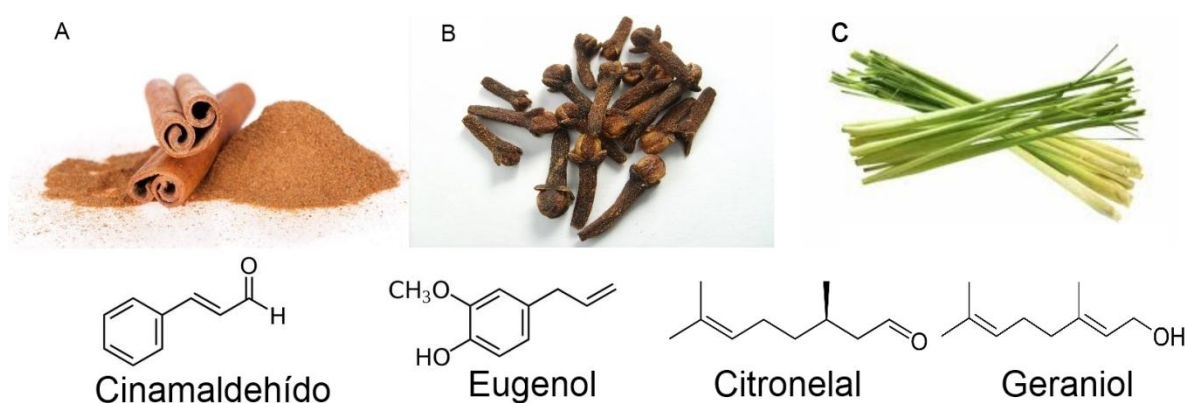


Figura 11. Estructura química de los compuestos activos mayoritarios en los aceites esenciales de: A) canela, B) clavo y C) citronela.

Los aceites esenciales poseen numerosas propiedades biológicas, entre las que ocupan un destacado lugar la actividad antimicrobiana. La mayor parte de los estudios sobre el mecanismo de acción de los aceites esenciales se centra en los compuestos activos mayoritarios para explicar dicha actividad. Los posibles mecanismos son la inhibición de la captación de glucosa, efectos sobre la permeabilidad de la membrana e interacción con las enzimas de la bacteria como la ATPasa (inhibe la generación de ATP a partir de glucosa). La propia estructura de los terpenoides fenólicos, a través del grupo hidroxilo y la presencia de electrones deslocalizados, desempeñan un papel importante en su capacidad antimicrobiana (Gill y Holley, 2004; Gill y Holley, 2006; Hyldgaard, Mygind, y Meyer, 2012).

La evaluación de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de canela, clavo y citronela revela que estos aceites inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Goñi *et al.*, 2009; Hammer, Carson, y Riley, 1999; Sato, Krist, y Buchbauer, 2006). Asimismo, en la literatura se describe que los AE de canela y clavo inhiben el crecimiento de mohos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Bakkali *et al.*, 2008). La mezcla de ambos aceites fue activa, además de los ya mencionados géneros, frente a *Mucor* y *Eurotium* y las levaduras *Debaryomyces* sp., *Pichia* sp., *Zygosaccharomyces* y *Candida lipolytica* (Matan *et al.*, 2006). Estos estudios también reflejan una clara dependencia de la actividad con la concentración de aceite esencial y además un efecto sinérgico entre los componentes mayoritarios con otros que, aún en pequeña concentración, son determinantes en la actividad del AE.

La mayor parte de las investigaciones que ponen de manifiesto la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se llevan a cabo mediante ensayos *in vitro* (métodos de difusión en pocillo, disco en placa de agar, medios líquidos, etc.) y en raras ocasiones utilizan alimentos como sistema modelo. Además, por lo general la actividad antimicrobiana se determina mediante un ensayo de contacto directo. Tradicionalmente se considera que los AE pueden añadirse al producto alimenticio en lugar del envase o contenedor; incluso si se añaden al envase, se asume que el AE ejerce su efecto únicamente por contacto directo y no a través de los compuestos volátiles presentes en la fase de vapor, lo que no siempre es el caso (Goñi *et al.*, 2009; Lopez, Sanchez, Batlle, y Nerin, 2005; López, Sánchez, Batlle, y Nerín, 2007). A pesar de ello, unos cuantos trabajos describen que tanto el cinamaldehído como el eugenol poseen actividad antimicrobiana en la fase de vapor (Goñi *et al.*, 2009), así como el boldo (*Peumus boldus* Mol.) y el poleo (*Lippia turbinata* var. *integrifolia* Griseb), que son antimicóticos efectivos al igual que muchos otros aceites esenciales (María Alejandra Passone, Girardi, y Etcheverry, 2013; María A. Passone, Girardi, Ferrand, y Etcheverry, 2012).

Además de la ya descrita actividad antimicrobiana, los aceites esenciales exhiben actividades biológicas frente a insectos. Por ejemplo, el carvacrol y el timol son tóxicos para las moscas (*Musca domestica*) (Schmidt y Streloke, 1994) y el limoneno inhibe el desarrollo y crecimiento de la cucaracha (*Blattella germanica*) (Schmidt *et al.*, 1994). Por otro lado, el aceite esencial de citronela y de clavo han demostrado repeler eficazmente a los insectos por su alta volatilidad y capacidad de acumulación así como por mantenerse en el tiempo. Algunos estudios recientes demuestran que la forma y zona de aplicación del aceite esencial, así como la naturaleza del aceite utilizado, se relacionan íntimamente con una mayor o menor protección frente a los mosquitos (Isman, 2006).

Envases alimentarios








Las principales funciones de los envases son proteger a los alimentos de los agentes externos (físicos, químicos o biológicos), contener y proporcionar a los consumidores información sobre los ingredientes y características nutricionales. La trazabilidad, conveniencia y manipulación son funciones secundarias de los envases que cada día cobran mayor importancia (Petersen *et al.*, 1999). El objetivo final del envase es contener alimentos de una manera coste-efectiva que satisfaga las necesidades de la industria y los deseos del consumidor, mantenga la seguridad alimentaria y minimice el impacto ambiental (Coles, McDowell, y Kirwan, 2003).

Debido a su amplia utilización en la Industria, los envases constituyen casi dos tercios del total del volumen de residuos de la alimentación (Hunt *et al.*, 1990). Los plásticos sintéticos son los

materiales más utilizados para el envasado de alimentos y bebidas y se clasifican en siete categorías (Tabla 2).

Estos polímeros presentan múltiples ventajas como su alta barrera frente a determinados gases, evitan la pérdida de humedad, presentan transparencia o protección frente a la luz (tanto visible como infrarroja o ultravioleta), facilitan el transporte, son higiénicos (barrera frente a microorganismos, plagas, etc.) y son altamente versátiles (Marsh y Bugusu, 2007). Sin embargo, la inherente escasa o nula biodegradabilidad de estos envases y el consiguiente impacto y repercusión negativa medioambiental al ser derivados del petróleo, hace difícil alcanzar la meta de la verdadera sostenibilidad.

Tabla 2. Clasificación de los plásticos derivados del petróleo según la Sociedad de Industriales del Plástico (SPI, 2013).

Tipo	Propiedades	Aplicaciones
 Poliétileno Tereftalato	Buena barrera a los gases y a la humedad, alta resistencia a la temperatura, transparente, fuerte, resistente, resistente a solventes	Bebidas, enjuagues bucales, gel de baño, fibra para ropa y alfombras
 Poliétileno de alta densidad	Excelente barrera a la humedad y productos químicos, fuerte y semiflexible, superficie suave, permeable a los gases	Detergente, blanqueador, bolsas de aperitivos, leche y bebidas no carbonatadas, juguetes, tuberías rígidas
 Cloruro de polivinilo	Excelente transparencia, fuerte y rígido, buena resistencia química, estable en el tiempo, baja permeabilidad a los gases	Tarjetas de crédito, cubiertas de suelos, marcos de ventanas y puertas
 Poliétileno de baja densidad	Flexible, buena transparencia, bajo punto de fusión. Buena barrera a la humedad	Filmes, bolsas, botellas flexibles, tuberías irrigación, cables, tapones de botella
 Polipropileno	Excelente resistencia química, alto punto de fusión, fuerte pero flexible, translúcido	Tapones de botellas, envases para ketchup, contenedores de yogurt y margarina, bolsas para patatas y galletas, bolsas de trabajo pesado
 Poliestireno	Claro a opaco, superficie vidriosa, rígido o espumoso, fuerte, quebradizo, alta claridad, sensible a grasa y solventes	Contenedores de yogurt, semillas, productos cárnicos frescos, cajas de huevos, envases de comida rápida, cubertería desechable
 Otros	Plásticos del sector ingeniería	Nylon (PA) Policarbonato (PC) Polímeros en multicapa o mezcla de polímeros

Envases biodegradables

Los argumentos que apoyan el desarrollo de envases biodegradables son abordar los problemas de eliminación de residuos sólidos y la sustitución de materias primas no renovables (petróleo, carbón, etc.) por las renovables (origen vegetal o animal), con el objetivo de impactos futuros cero *“from cradle to ground”* (“de la cuna a la tierra”) (Vink, Rábago, Glassner, y Gruber, 2003). Un ejemplo de ello es la comercialización de ácido poliláctico obtenido a partir de jarabe de maíz y que una vez hidrolizado se recupera como ácido láctico (proceso realizado en una plataforma global que provee de polímeros y productos químicos sostenibles y versátiles obtenidos íntegramente a partir de recursos renovables, Cargill Dow LLC).

El desarrollo y elaboración de envases y recubrimientos biodegradables procedente de fuentes renovables y de uso alimentario presenta como característica el formar películas con propiedades (mecánicas, de barrera y de transmisión de la luz) semejantes a los plásticos derivados del petróleo pero con una alta capacidad de biodegradación. Gran parte de estos materiales son comestibles y altamente biodegradables, siendo foco de atención y objeto de estudio en los últimos años por su potencial en el desarrollo de envases y recubrimientos comestibles y biodegradables. Estos recubrimientos no pretenden ser sustitutos de los envases en su totalidad, pero si pueden ser una alternativa de parte de ellos, en especial de los que están en contacto íntimo con el alimento. En algunas ocasiones estos envases, recubrimientos pueden ser ingeridos con el alimento o incluso formar parte del mismo.

La variedad de biopolímeros utilizados en la obtención de estos recubrimientos es amplia, con el único requisito de poseer capacidad filmogénica. En este sentido, los recubrimientos a base de polisacáridos (alginato, agar, celulosa, almidón, dextrina, quitosano, etc.) y proteínas (soja, gelatina, gluten, caseína, etc.) poseen propiedades mecánicas y organolépticas adecuadas, mientras que las ceras (cera de abeja, carnauba, etc.) y los lípidos o sus derivados mejoran la barrera al vapor de agua. Aunque todos ellos presentan ciertas limitaciones, la principal desventaja suele ser la escasa barrera al agua.

Un recubrimiento comestible envuelve al alimento, se puede consumir como parte del mismo (Pastor, Vargas, y González-Martínez, 2005), y su función es mantener la calidad de los productos retrasando las principales causas de alteración a través de diferentes mecanismos: por ejemplo, evitando modificaciones en la textura o turgencia a través del control de la ganancia o pérdida de humedad, ralentizando cambios químicos que pueden afectar al color, aroma o valor nutricional del alimento, actuando como barrera a los gases (frente a la

oxidación de lípidos, vitaminas y pigmentos), mejorando la estabilidad microbiológica o la integridad mecánica en el caso de las frutas y hortalizas, etc., (Frédéric Debeaufort, Quezada-Gallo, y Voilley, 1998; Kester y Fennema, 1986).

Los recubrimientos biodegradables son de dos tipos: coberturas y películas, y ambos son adecuados para su aplicación sobre alimentos mínimamente procesados, congelados, frutas, hortalizas enteras o en trozos, quesos, etc. Las propiedades físicas y funcionales de los envases y recubrimientos dependen de la formulación utilizada, disolventes, agentes plastificantes, método de preparación y aplicación (humedad relativa, temperatura), ya que estas propiedades están ligadas a la estructura molecular del biopolímero utilizado y pueden modificarla sustancialmente.

Una **cobertura**, proporciona una capa protectora por inmersión del alimento en una mezcla filmogénica base de biopolímero (Jiang y Li, 2001), que se deja secar al aire para que se forme una fina membrana sobre la superficie del alimento (Fig. 12). Si bien la mayor parte de las investigaciones sobre coberturas comestibles están enfocadas a la conservación de frutas (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, y Martín-Belloso, 2009), también se han aplicado con éxito a productos de la pesca (López-Caballero *et al.*, 2005) y productos cárnicos (Quintavalla y Vicini, 2002). Las coberturas controlan la transferencia de la humedad, el intercambio de gases, los procesos de oxidación y el crecimiento de microorganismos. Una de las principales ventajas de la utilización de coberturas comestibles es que se pueden incorporar ingredientes activos a la matriz del polímero que se consumen con el alimento y por lo tanto mejorar la calidad o incluso los atributos nutricionales y sensoriales del mismo (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005; Park, 1999). En ocasiones se requiere que la cobertura sea inapreciable sensorialmente, lo cual supone un reto y presenta una limitación tecnológica; en otras, la cobertura se aplica con el fin de formar una “piel” que proteja el alimento, por lo que tendrá unas características (grosor, color, etc.), fácilmente apreciables.

Una **película** es una capa preformada desarrollada para revestir, cubrir, separar o envolver distintos alimentos y/o extender la vida útil (Fig. 12). Generalmente se preparan mediante la técnica de moldeo (*casting*) de una solución acuosa (solución filmogénica) que posteriormente sufre un proceso de secado. Por lo general, la formación de la película involucra fuerzas inter e intra-moleculares o entrecruzamiento de las cadenas poliméricas para formar una matriz semi-rígida en 3D que permita inmovilizar o atrapar parte del solvente. El grado de cohesión depende del tipo de polímero, estructura, solvente utilizado, temperatura y presencia de otras moléculas como plastificantes o compuestos activos (Tharanathan, 2003). Las películas biodegradables y/o comestibles fortalecen o sustituyen capas naturales del alimento para

prevenir pérdidas por humedad y además permiten el intercambio selectivo y controlado de gases (Embuscado y Huber, 2009; Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, e Ibarz, 2011). Una película también puede proporcionar esterilidad en la superficie y evitar la pérdida de componentes importantes. Al igual que en las coberturas, las películas pueden activarse mediante la adición de compuestos activos o bioactivos (Campos, Gerschenson, y Flores, 2011; Sánchez-González, Vargas, González-Martínez, Chiralt, y Cháfer, 2011).

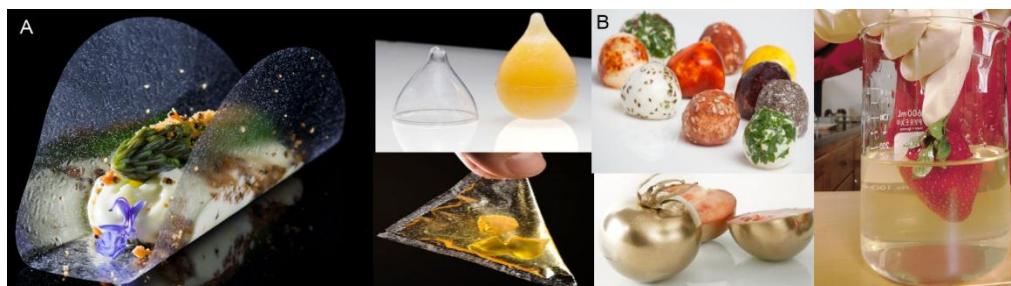


Figura 12. Recubrimientos comestibles: A) películas y B) coberturas ¹

Los polímeros naturales comúnmente utilizados para el desarrollo de recubrimientos (Fig. 13), están basados en biomoléculas que son compatibles entre sí y con otros hidrocoloides, tensoactivos y aditivos.

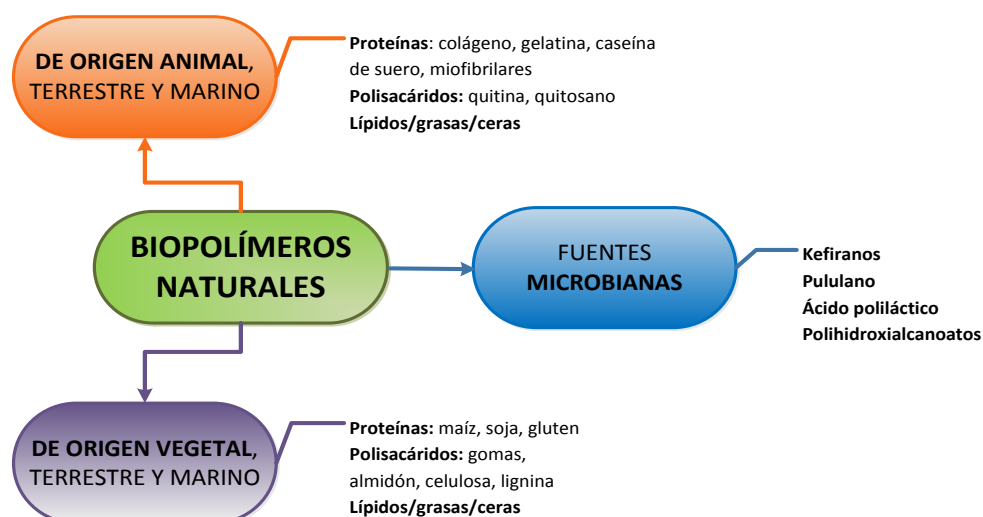


Figura 13. Fuentes de biopolímeros naturales utilizados como base de recubrimientos biodegradables.

¹ (MolecularRecipes, 2013; TheDeliGarage, 2013; TrulyDeeply, 2013; Yanyun Zhao, 2007)

Además del material con capacidad filmogénica, la elaboración de envases comestibles y recubrimientos requiere en muchos casos de aditivos o ingredientes. Entre ellos, los plastificantes (como el sorbitol, etilenglicol, glicerol, etc.) se incorporan a la formulación, ya que sin ellos las películas resultantes podrían ser muy frágiles y poco flexibles. A modo de ejemplo, el glicerol (plastificante hidrófilo, polar, no volátil, con alto punto de ebullición), al incorporarse en una proporción adecuada puede reducir las fuerzas intermoleculares y aumentar la movilidad de las cadenas del polímero, por lo que generalmente se utiliza para mejorar las propiedades mecánicas de las películas comestibles (Cheng, Karim, y Seow, 2006; Ghasemlou, Khodaiyan, Oromiehie, y Yarmand, 2011). Por otro lado, además de plastificante, el sorbitol (un poliol con habilidad para aumentar el espacio intermolecular al debilitar los puentes de hidrógeno) combinado con el glicerol, aumenta la permeabilidad al vapor del agua y la resistencia mecánica de las películas, si bien reduce la flexibilidad que le aporta el glicerol (Chick y Ustunol, 1998). Por ello, en muchas ocasiones glicerol y sorbitol se utilizan a partes iguales buscando así un efecto intermedio y equilibrado. Los plastificantes se combinan con el resto de ingredientes variando sus proporciones en función de las propiedades finales que se desee conferir al envase.

Tal y como se ha comentado, los materiales utilizados en la preparación de recubrimientos y películas proceden de diversas fuentes del reino animal y vegetal, tanto terrestre como marino, así como de microorganismos (Tharanathan, 2003). La naturaleza de estos compuestos es muy diversa, siendo principalmente de origen proteico (soja, suero de leche, zeína, gluten, gelatina, etc.), polisacárido (almidón, celulosa, agar, gomas, pectinas, quitosano, etc.) y lipídico (grasas, aceites, ceras). Las características de los recubrimientos en parte dependerán de la naturaleza de estos compuestos. En función al material biopolimérico utilizado en la formulación, los recubrimientos se clasifican en las siguientes categorías.

Recubrimientos polisacarídicos

Los polisacáridos se caracterizan por su compleja estructura química y diversidad funcional como dureza, adherencia, propiedad gelificante, espesante y capacidad para formar películas. El almidón, alginato, ésteres de celulosa, quitosano, carragenina o pectinas son algunos ejemplos de polisacáridos. Los recubrimientos obtenidos a partir de estos materiales son por lo general transparentes y flexibles. Las propiedades de barrera de estos polímeros dependen de la estructura química, peso molecular y grado de desacetilación, nivel de entrecruzamiento y grado de sustitución como es el caso del quitosano, alginato y los almidones, respectivamente.

Las características de algunos de estos biopolímeros como quitosano, alginato y agar se han descrito anteriormente con más detalle, pues se utilizarán como materiales para elaborar recubrimientos en la presente Memoria.

Recubrimientos proteicos

Los biopolímeros proteicos forman redes macromoleculares tridimensionales que se estabilizan mediante interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes. La formación de la red tridimensional e interacciones dependerán de su composición aminoacídica, el tamaño molecular y su disposición tridimensional. Las proteínas globulares, frecuentemente de bajo peso molecular (como las proteínas de aislado de soja) y las proteínas sarcoplásmicas, hacen redes más compactas y menos elásticas, con menor resistencia mecánica (Mauri y Añón, 2008). También se puede modificar la estructura de la proteína y mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera por desnaturalización y agregación.

Los recubrimientos biodegradables proteicos se formulan a partir de proteínas de diferente origen, tanto animal como vegetal. Así se pueden encontrar en la literatura películas de gelatina (Giménez, Alemán, Montero, y Gómez-Guillén, 2009), caseína, proteína aislada o concentrada del suero lácteo (Banerjee y Chen, 1995), gluten de trigo (Gontard, Guilbert, y Cuq, 1992) y proteína de soja (Brandenburg, Weller, y Testin, 1993), entre otras. La gran versatilidad de las proteínas permite disponer de un amplio abanico de posibilidades en el desarrollo de películas a partir de estos biopolímeros. Recientemente también se han desarrollado películas a partir de proteínas miofibrilares de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenidas en condiciones alcalinas que presentan una gran resistencia al agua (Blanco-Pascual, Fernández-Martín, y Montero, 2013). Por otro lado, algunos investigadores han observado que la adición de lípidos en matrices poliméricas da lugar a emulsiones que mejoran considerablemente las propiedades físicas de las películas, protegen las características organolépticas y evitan la fotodegradación de los alimentos (Monedero *et al.*, 2010).

Incorporación de compuestos bioactivos en los recubrimientos

Un método para conseguir envases con propiedades activas es mediante la incorporación de agentes activos y/o bioactivos. Las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, repelentes, etc., de un compuesto incorporado a los envases o recubrimientos podrán influir en el

deterioro de los alimentos, al igual que en el ataque de insectos, aspectos en los que se ha basado la presente memoria.

Los antioxidantes incorporados a los envases comestibles aumentan la estabilidad de los alimentos al reducir o retrasar la oxidación de lípidos u otros compuestos (proteínas, vitaminas, etc.), manteniendo su valor nutricional y características propias (Quezada-Gallo, 2009). Estos compuestos, en el caso de ingerirse conjuntamente con el envase, pueden ejercer una acción protectora frente a los efectos perjudiciales producidos por los radicales libres (Gülçin, 2012). Los antioxidantes incorporados a recubrimientos y películas comestibles son numerosos, por ejemplo, compuestos polifenólicos procedentes de té verde (López de Lacey, López-Caballero, y Montero, 2013), ácido ascórbico, ácido cítrico, etc. (Rojas-Graü *et al.*, 2009) o carotenos, (Kristal, 2004; Mohanty, Saxena, Singh, Goyal, y Arora, 2005). Los compuestos con propiedades antimicrobianas se utilizan para garantizar la seguridad de los alimentos y aumentar la vida útil mediante el control de la microbiota. Entre los antimicrobianos más comúnmente empleados destacan los ácidos orgánicos, quitosano, polipéptidos, extractos de plantas y aceites esenciales (Campos *et al.*, 2011).

La industria de alimentos ha utilizado aceites esenciales incorporados en materiales de envasado a base de polímeros naturales (coberturas y películas) como agentes conservantes por su efecto antimicrobiano y antioxidante con resultados prometedores (Fernandez-Saiz, Soler, Lagaron, y Ocio, 2010; Gómez-Estaca *et al.*, 2010; Holley y Patel, 2005; Kechichian, Ditchfield, Veiga-Santos, y Tadini, 2010; Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, y Bigger, 2011; Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier, y Lacroix, 2004). Así, por ejemplo se ha utilizado aceite de clavo en películas de quitosano para extender la vida útil de lomos de bacalao (*Gadus morhua*) (Gómez-Estaca *et al.*, 2010), películas comestibles a base de proteínas de suero con AE de orégano para extender la vida útil de músculo de carne (Oussalah *et al.*, 2004) o para extender la vida útil de frutas tanto en película como en cobertura utilizando diversos materiales biopoliméricos y aceites esenciales (Rojas-Graü *et al.*, 2009), entre otras aplicaciones.

Salvo casos excepcionales, los AE incorporados a las películas o coberturas confieren sabores y olores intensos que se pueden transferir a los alimentos, modificando sus propiedades organolépticas, resultando un nuevo producto condimentado. Por este motivo, la aplicación de aceites esenciales en las películas queda restringida, puesto que en algunos no interesa que el producto adquiera olor ni sabor. Por tanto, el estudio de nuevos métodos o formas de aplicación del AE para paliar y contrarrestar este efecto es de gran interés. En este sentido, la elaboración de películas bicapa o multicapa podría ser una estrategia adecuada. En estas

películas, el aceite esencial o el compuesto activo se podría aplicar en la superficie externa para evitar el contacto directo con el alimento, de manera que la migración de los compuestos, si fuera el caso, sea lenta o se limite a los compuestos localizados en la capa más externa o a los más volátiles.

Por otra parte, los repelentes e insecticidas sintéticos se utilizan habitualmente con el consiguiente problema ambiental de la migración de las moléculas repelentes al flujo de aire o incluso al agua, lo cual se vería mitigado con el uso de compuestos alternativos como son los aceites esenciales. La baja toxicidad de los AE se puede reducir e incluso controlar a través del uso de materiales poliméricos que sirvan como soporte de estos compuestos activos. En este sentido sería interesante investigar la utilización de matrices que permitan la liberación controlada del AE y que mantenga sus propiedades activas, con la consiguiente reducción de la toxicidad hacia el medioambiente ocasionada por los insecticidas químicos y favoreciendo así a la agricultura sostenible. Algunos autores han llevado a cabo numerosas investigaciones de aceites esenciales nanoencapsulados en matrices poliméricas con excelente capacidad insecticida (Bhattacharyya, Bhaumik, Rani, Mandal, y Epidi, 2010; Perlatti y de Souza Bergo, 2013), pero se conoce muy poco sobre la inclusión de aceites esenciales en películas biodegradables con este fin.

Los aceites esenciales cuando se incorporan a películas y coberturas modifican sus propiedades debido a su naturaleza hidrofóbica. Así por ejemplo, pueden incorporarse para mejorar las propiedades de barrera y además ejercer otros efectos positivos referidos anteriormente, tales como la protección contra el crecimiento microbiano y la oxidación de lípidos (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010; Holley y Patel, 2005; Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier, y Lacroix, 2004; Rojas-Graü *et al.*, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2007; Sánchez-González, González-Martínez, Chiralt, y Cháfer, 2010; Sánchez-González, Vargas, González-Martínez, Chiralt, y Cháfer, 2011; Zivanovic, Chi, y Draughon, 2005). Los AE también pueden provocar una mejora en los valores de permeabilidad al vapor de agua y gases (Rojas-Graü *et al.*, 2007; Sánchez-González *et al.*, 2010; Sánchez-González *et al.*, 2011), que generalmente disminuyen en proporción a la cantidad de aceite esencial. Las propiedades mecánicas de las películas también se ven afectadas. Así, Rojas-Graü *et al.*, (2007) observaron una reducción significativa de las propiedades mecánicas (tensión) de películas basadas en alginato con la incorporación de diferentes aceites esenciales. Los aceites esenciales también reducen la transparencia, color y brillo de las coberturas (Sánchez-González *et al.*, 2010; Sánchez-González *et al.*, 2011).

En general, la tendencia en la elaboración de envases activos biodegradables con las mencionadas características se basa en seleccionar compuestos procedentes de fuentes naturales y en los que su seguridad esté avalada. En la literatura se describen una gran variedad de ingredientes activos/bioactivos naturales o no, propuestos para tal fin. Sin embargo, en numerosas ocasiones su utilización queda restringida por diversas causas. Así, los aceites esenciales tienen un olor muy intenso, por lo que se deben utilizar en pequeña cantidad; otros son poco efectivos en las dosis permitidas en la legislación, etc. Por lo tanto, hoy en día la búsqueda de compuestos que reúnan las características adecuadas constituye un reto para investigadores y profesionales del sector industrial.

Numerosos compuestos activos y/o bioactivos parecen tener efectos beneficiosos y su incorporación a recubrimientos (tanto coberturas como películas) continua siendo motivo de estudio. Para Silva-Weiss, Ihl, Sobral, Gómez-Guillén, y Bifani, (2013), la incorporación de aditivos naturales a sistemas de envasado activo en base a biopolímeros puede generar cambios en la estructura de la película, por lo que su funcionalidad se verá directamente afectada. La funcionalidad final de las películas comestibles está relacionada con sus propiedades activas y/o bioactivas (antioxidantes, antimicrobianas, entre otras), propiedades funcionales (permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, resistencia a la tensión) y propiedades físicas (solubilidad, opacidad y color). Sin embargo y a pesar de la amplia gama de productos naturales con propiedades activas y bioactivas, poco se conoce sobre la posibilidad de aplicar estos recubrimientos directamente en alimentos o protegiendo cultivos. Este hecho tiene un marcado interés en la industria agroalimentaria, de ahí su importancia en el desarrollo de envases activos.

Degradación

Una práctica común en agricultura es proteger los cultivos mediante grandes bolsas para prevenir picaduras de insectos y aves (Fig. 14). Esta práctica asegura la calidad del fruto pero la retirada del material de envoltura supone un coste adicional y un problema medioambiental si las bolsas no se degradan en un tiempo razonable. Este hecho constituye un aspecto más de interés en los materiales biodegradables. El recubrimiento de los plantones por el método de acolchado “*mulching*-plástico” (Fig. 15) es otro sistema de utilización de plásticos durante un periodo corto de tiempo que también requiere mano de obra para su eliminación una vez que la planta ha crecido. La función en este caso es evitar las malas hierbas; mantener la humedad

y proteger de las heladas ya que una menor evaporación del suelo y un microclima más húmedo torna a la planta menos vulnerable a enfermedades como *Botrytis* sp., *Oídio* sp., etc.



Figura 14. Aplicación de bolsas de plástico en el cultivo de plátano (Agrocabildo, 2010).



Figura 15. Acolchado “mulching” plástico en agricultura².

² Singh, Deka, y Kumar, 2012; www.agrojoliwordpress.com

superior a los 30 años (Yamada-Onodera, Mukumoto, Katsuyaya, Saiganji, y Tani, 2001). Si bien degradación es cualquier cambio físico o químico como resultado de factores ambientales (luz, calor, humedad, condiciones químicas o actividad biológica), estos procesos inducen cambios en la estructura y funcionalidad de los polímeros como resultado de la ruptura de enlaces y subsecuentes transformaciones químicas. La degradación se refleja en cambios en las propiedades mecánicas, ópticas o eléctricas en la rotura, decoloración, separación de fases, delaminación, etc., (Kyrikou y Briassoulis, 2007; Shah, Hasan, Hameed, y Ahmed, 2008).

Los microorganismos están involucrados en la degradación, tanto de polímeros naturales como sintéticos. La biodegradación de los plásticos ocurre activamente bajo condiciones específicas de acuerdo a sus propiedades y al tipo de microorganismo, que por otro lado requiere condiciones óptimas de crecimiento. Durante el proceso, los polímeros se degradan a sus monómeros más pequeños para después ser mineralizados. Generalmente un incremento en el peso molecular de los polímeros provoca una disminución en la biodegradabilidad. En este contexto Gontard, Guilbert, y Cuq, (1992) clasificó los polímeros biodegradables en tres grupos: a) mezclas de polímeros sintéticos (polietileno) con biopolímeros naturales, b) polímeros bacterianos (polihidroxialcanoatos) y c) biopolímeros con mayor o menor grado de modificación (polisacáridos o proteínas). Considerando el bajo coste del material de partida (ya que en muchos casos se trata de subproductos o recursos infrautilizados), los polímeros naturales son objeto de estudio para el desarrollo de plásticos biodegradables. Así por ejemplo, la gelatina es susceptible a la acción de enzimas (ej. proteasas) presentes en numerosos microorganismos (Abrusci *et al.*, 2007) y las películas a base de proteína de suero se biodegradan por *Pseudomonas aeruginosa* (Li y Chen, 2000).

Algunos estudios ponen de manifiesto el efecto de las modificaciones químicas sobre el tiempo de biodegradación. Así, el entrecruzamiento en mezclas de gelatina y soja aumenta el tiempo de degradación de las películas hasta 33 días en comparación con aquellas que no fueron entrecruzadas y que se degradaron en apenas 14 días (González *et al.*, 2011). Otros autores estiman en alrededor de 55 días la biodegradación de películas de proteína de soja y ácido poliláctico (González y Alvarez Igarzabal, 2013). En el caso de la lignina, cuando está presente en una mezcla, la degradación parece disminuir. Este hecho podría estar asociado a un efecto de protección bioquímico de la lignina contra el ataque de microorganismos (Mousavioun, George, y Doherty, 2012). Sin embargo, la biodegradación de películas activas está muy poco estudiada (con escasas o ninguna referencia bibliográfica), una vez utilizada para el fin para el que se fue diseñando, o bien cuando se somete a un periodo de envejecimiento.

II. Hipótesis

En los últimos años ha surgido una creciente preocupación con respecto a la gran cantidad de residuos y productos infrautilizados procedentes de la agroindustria, que pueden tener un papel importante frente a los problemas de alimentación y de contaminación del medio ambiente. La dificultad principal radica en encontrar tecnologías óptimas para el aprovechamiento de este material que supongan una mínima inversión y ser así competitivos. Asimismo es de gran interés la búsqueda de aplicaciones específicas a estos materiales que les confieran un valor añadido.

La mayoría de los biopolímeros y compuestos activos utilizados para el desarrollo de recubrimientos y envases proceden de recursos de la agroindustria. Muchos de ellos han sido estudiados como posibles sustitutos a los plásticos sintéticos tradicionales en algunas de sus aplicaciones, por ejemplo como envases tipo bolsas y también como envase comestible en contacto directo con el alimento (envase intermedio). Sin embargo, el comportamiento de estos materiales depende de sus propiedades intrínsecas ya que constituyen parte de la matriz de soporte y se incorporan como un ingrediente activo dentro de la formulación. Los compuestos que forman parte del envase o recubrimiento no deben alterar la calidad del alimento al que protegen o del que forma parte; caso contrario, es necesario buscar estrategias tecnológicas para evitar este problema. En este sentido la aplicación de sistemas multicapa durante el desarrollo de películas es una opción prometedora para evitar los cambios en las propiedades sensoriales de los alimentos. En muchos casos el envase, además de proteger, se convierte en un vehículo de compuestos activos que ejercen su acción, tanto si difunde sobre el alimento como si genera una atmósfera protectora.

Los materiales objeto de estudio en la presente Memoria tiene interés por diversas razones. La gestión de los residuos procedentes de la acuicultura, específicamente del procesado de crustáceos, son fuente de continua preocupación, ya que en las industrias transformadoras los acumulan en una gran cantidad. Los métodos tradicionales son muy parciales en la utilización de estos recursos, y se descarta gran cantidad de material de gran valor biológico y nutritivo, con el consiguiente problema ambiental. El quitosano es el residuo más abundante, pero otros materiales de gran valor como las proteínas, lípidos, carotenoides y otros compuestos se suelen descartar.

Los productos infrautilizados de la agroindustria son otros materiales cuya aplicación en el desarrollo de envases o recubrimientos es de gran interés por sus múltiples propiedades funcionales y en especial las filmogénicas, entre ellos se encuentran el alginato, el agar, la proteína de aislado de soja, la lignina y los aceites esenciales. Alguno de ellos poseen además

propiedades bioactivas y son agentes efectivos antioxidantes, antimicrobianos e insecticidas, que por su versatilidad son susceptibles de formar parte del material de recubrimiento y/o envasado y proteger o extender la vida útil de los alimentos.

El objetivo de la presente Memoria es la utilización de diversos materiales procedentes de la industria agroalimentaria (residuos y/o excedentes) para el desarrollo de recubrimientos. No existe un recubrimiento (película o cobertura) ideal, sino que cada formulación se adecúa a un caso concreto ("a medida"). Por este motivo se plantea el desarrollo de recubrimientos específicos en base a materias primas seleccionadas, (biopolímeros, compuestos activos, etc.) así como el desarrollo tecnológico (película, cobertura, multicapa, reticulación, etc.), adecuado cada caso, para su posterior aplicación en agroalimentación.

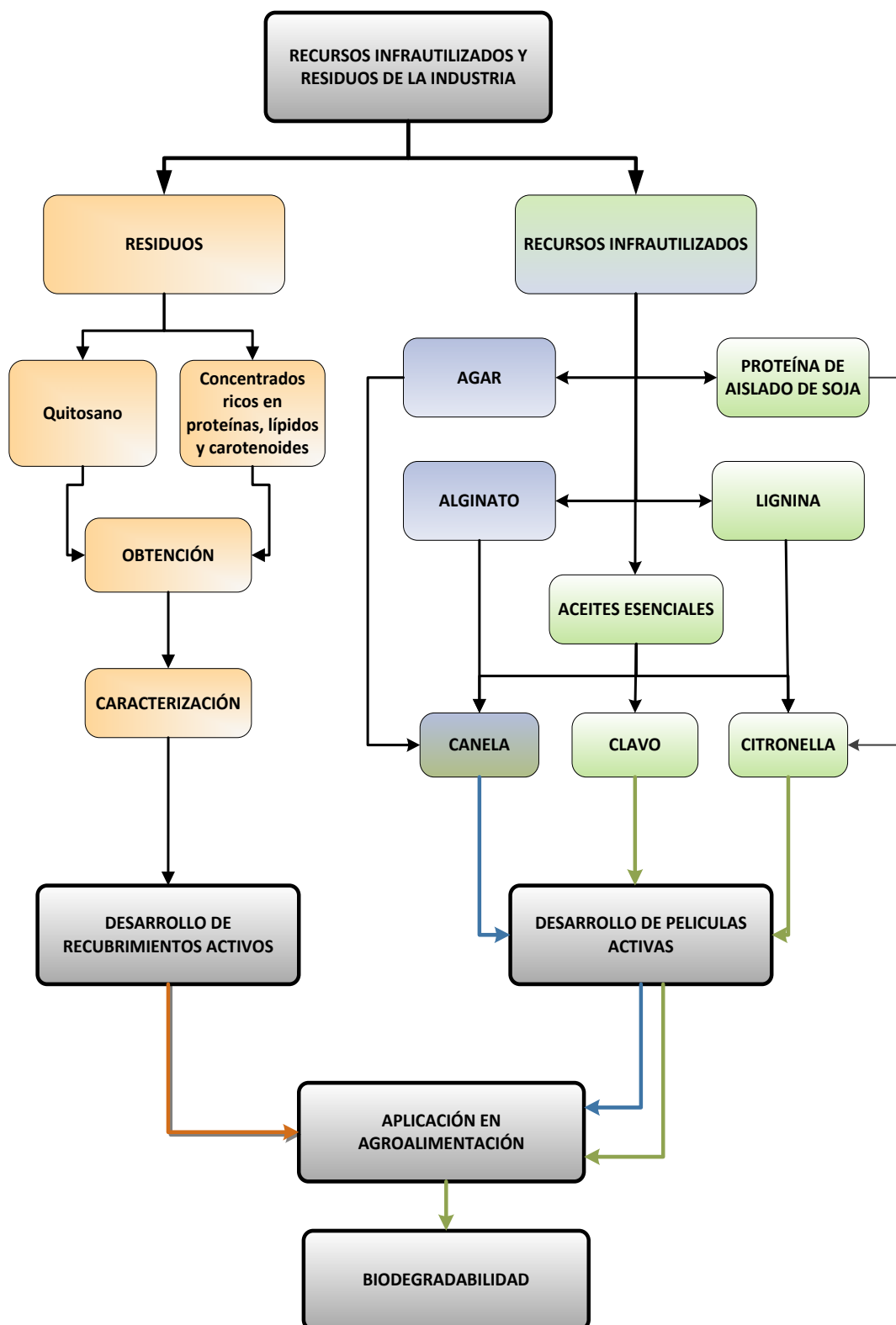
III. Objetivos

El objetivo general de la presente memoria es el diseño y elaboración de recubrimientos, a partir de hidrocoloides y compuestos activos procedentes de recursos infrautilizados y residuos de la industria, para su aplicación en agroalimentación.

La consecución de este objetivo se llevará a cabo mediante los siguientes objetivos parciales:

1. Valorización de los residuos de la industria procesadora de crustáceos y obtención del material polimérico y activo, principalmente quitosano, proteínas, lípidos y carotenoides, mediante métodos respetuosos con el medio ambiente y manteniendo su funcionalidad.
2. Diseño y desarrollo de recubrimientos con el material obtenido de los residuos de crustáceos y caracterización de sus propiedades tecnológicas y activas.
3. Aplicación de recubrimientos de quitosano y extractos lipoproteicos de crustáceos a productos de la pesca y acuicultura durante la conservación en estado refrigerado
4. Diseño y desarrollo de recubrimientos en bicapa a partir de agar o de alginato con la incorporación de aceites esenciales, caracterización de sus propiedades y su aplicación en alimentos.
5. Diseño y desarrollo de películas en bicapa de proteína de soja, lignina y aceites esenciales con actividad insecticida y fungicida para su aplicación en agrocultivos y evaluación de su estabilidad y biodegradabilidad.

IV. Diseño experimental



V. Materiales y métodos

Obtención de quitosano, método químico

La obtención de quitosano a partir de caparazones de langostino (*Litopenaeus vannamei*) se realizó según los métodos descritos por Lalaleo (2010). Estos métodos básicamente constan de dos procedimientos: uno que conlleva la obtención de quitina (Q) y otro que suprime esta etapa.

La obtención de quitosano (Ch) previa recuperación de quitina se llevó a cabo mediante la desproteinización de los caparazones de langostino con 0,5% NaOH p/v (0,125 M³) a 80 °C durante 30 minutos; el sólido remanente se lavó con abundante agua hasta llegar a un pH cercano a la neutralidad. Se realizó una segunda desproteinización con 3% NaOH p/v (0,75 M) a 80 °C durante 10 minutos, proceso que se ejecutó por triplicado. La eliminación del contenido mineral se realizó con HCl 2M en una relación 1:3 (v/v) a temperatura ambiente durante 60 minutos. La quitina obtenida se lavó hasta pH neutro y se secó en una estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) a 50 °C durante 6 horas.

La desacetilación alcalina de quitina se realizó con 50% NaOH (p/v) (12,5M) a 100 °C con una modificación al método descrito por Alvarado *et al.*, (2007) mediante la adición o no de NaBH₄ como agente reductor (R) a una concentración de 0,83 g/L, y un tiempo de desacetilación de 2 ó 4 horas. El quitosano se lavó hasta alcanzar al neutralidad y se secó en estufa a 50 °C durante 6 horas.

Para la producción de quitosano sin la obtención previa de quitina (Alvarado *et al.*, 2007), los caparazones de langostino se desmineralizaron directamente con HCl 2 M durante 72 horas. La desacetilación alcalina de los caparazones se realizó con 50% NaOH (p/v) a 100 °C mediante la adición o no de NaBH₄ como agente reductor a una concentración de 0,83 g/L, y un tiempo de desacetilación de 2 ó 4 horas. El quitosano se lavó hasta alcanzar la neutralidad y se secó en estufa a 50 °C durante 6 horas.

Recuperación de materiales activos

Los residuos (cabeza y exoesqueleto) de langostino se suspendieron en agua (relación 1:1 p/v) y se sometieron a una autólisis mediante la incubación a 40 °C durante 4 h con agitación constante. Tras la inactivación térmica a 80 °C durante 20 min, la suspensión con los residuos autolisados se mantuvo a 2 °C durante 12 h. Con esta suspensión se llevó a cabo la primera

³ La concentración de NaOH se expresa en porcentaje en peso (% p/p) con fines comparativos con las referencias bibliográficas. No obstante se ha incluido su concentración como molaridad (M)

extracción orgánica utilizando una mezcla de acetona: etanol (1:1 v/v) a 40 °C durante 2 h con agitación constante y una proporción suspensión de residuos: disolvente de 1:3 (p/v). Después de 3 horas de decantación, se formaron tres fases bien definidas: I) fase superior, compuesta por un líquido transparente con un color amarillento, que se mantuvo a 2 °C y se mezcló con la fase orgánica obtenida de la fase II, II) fase intermedia, de color naranja intenso y opaca, de aspecto viscoso y III) material quitinoso, compuesto por restos de caparazón de color naranja. La fase intermedia (II) se filtró a través de un lienzo para separar el residuo sólido, material quitinoso, que se incorporó al material recuperado de la fase III. La fase líquida resultante se sometió a extracciones orgánicas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Las fases orgánicas de las fases I y II se concentraron por rotaevaporación, que condujo a la obtención de un extracto de lípidos de color naranja intenso (CE), que se mantuvo a 40 °C en la oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno hasta su uso. La fase acuosa se centrifugó (10000 x g, 30 min, 5 °C), los sobrenadantes fueron descartados y el residuo sólido liofilizado constituyó el concentrado lipoproteico de la extracción de carotenoides, (PCc). Parte de este concentrado se suspendió en agua (2,5 % p/v) y se sometió a una hidrólisis con Alcalasa® 2.4L (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) a 50 °C y pH 8,5 durante 3 h con una relación enzima: sustrato de 1:20 (p/p) usando un pH-estato (TIM 856, Radiómetro Analítica, Villeurbanne Cedex). La reacción se detuvo por inactivación de la enzima a 90 °C durante 10 min; el producto resultante se centrifugó a 5000 x g durante 15 min. El sobrenadante se liofilizó y constituyó el hidrolizado proteico (HPC), derivado de PCc. El material quitinoso (recogido de las fases II y III) fue sometido a sucesivos lavados con agua destilada y posteriormente se filtró manualmente a través de una gasa. La fase líquida resultante se centrifugó (10000 x g, 30 min, 5 °C), el sobrenadante se descartó y el precipitado, una vez liofilizado, constituyó el concentrado lipoproteico, (PCw). El material quitinoso lavado se sometió a una desmineralización con ácido láctico (75,6 g/L), en una relación de 1:3 (p/v), durante 36 horas a 21 °C. La eliminación de proteínas se llevó a cabo mediante una hidrólisis enzimática con Viscozyme® L (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) (pH 4,5, 50 °C) seguido por una hidrólisis con Alcalasa® 2.4L (pH 8,5, 50 °C), utilizando un pH-estato. Después de la inactivación enzimática (90 °C, 10 min), la fracción acuosa se recuperó y centrifugó a 5000 x g durante 15 min. El precipitado resultante se liofilizó para constituir el hidrolizado de proteína (HPch), derivado del material quitinoso lavado y desmineralizado. El material sólido constituye la quitina.

Obtención de quitosano Ch40

La quitina obtenida en la etapa anterior se sometió a un proceso de desacetilación con 40 % de NaOH (10 M), proporción 1:7 (p/v) durante 4 horas a 110 °C. Después el material fue filtrado, lavado y secado en una estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) a 45 °C.

Obtención de quitosano Ch10

La quitina obtenida en la etapa anterior se sometió a un proceso de desacetilación con 10 % de NaOH (2,5 M), proporción 1:7 (p/v) durante 72h horas a 100 °C. Después el material fue filtrado, lavado y secado en una estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) a 45 °C.

Obtención de quitosano con enzimas de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*

Obtención del extracto crudo enzimático de *C. Lindemuthianum*: El medio líquido de cultivo se preparó disolviendo los siguientes ingredientes en agua destilada: 1,5% glucosa, 0,66% prolina, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,18% ZnSO₄·7H₂O, 0,1% FeSO₄·7H₂O, 0,03% MnSO₄·H₂O, 0,04% CuSO₄·5H₂O, 0,1% tiamina y 0,1% ácido nicotínico, pH 5 (Tsigos *et al.*, 1996). El hongo se cultivó en una incubadora rotacional a 150 r.p.m., 30 °C durante 5 días. El micelio y la enzima extracelular se separaron por filtración con un embudo Büchner. El sobrenadante se utilizó como fuente de enzima extracelular (Win *et al.*, 2001).

Obtención del extracto crudo enzimático de *M. Rouxii*: La cepa se cultivó en agar patata-dextrosa (PDA, Scharlab, Barcelona, España.), a 30 °C durante 5 días, hasta la producción de esporas. Las esporas se recogieron en una solución estéril de Tween 80 (0,01% v/v) en agua. La suspensión de esporas (aproximadamente 10⁶ esporas/ml), se colocó en un recipiente con medio de cultivo líquido estéril (preparado con 0,3% de extracto de levadura, 1% de peptona y 2% de glucosa, a pH 4,5), (Bartnicki-Garcia y Nickerson 1962). El medio con las esporas se incubó con agitación a 28 °C durante 48 h. Seguidamente, el micelio se separó del medio por filtración con embudo Büchner, se lavó con abundante agua destilada fría y se congeló a -20 °C. Posteriormente, el micelio congelado se trituró con Alumina A-5 (Sigma; 1:2 p/p) en un mortero a 0 °C durante 15 min. Durante la trituración se añadió gradualmente una solución tamponada de 25 mM Tris-HCl, pH 7,2, (relación 1:7 p/v micelio húmedo: solución tamponada). El homogenizado se centrifugó a 0 °C a 4000 x g durante 10 min y posteriormente a 6000 x g durante 120 min. El sobrenadante se utilizó como el extracto crudo enzimático.

Biotransformación de la quitina

La quitina (obtenida de la recuperación de materiales activos, Capítulo 2) se sometió a tres tratamientos químicos diferentes con fines comparativos para facilitar la acción enzimática. En primer lugar, la quitina (0,5 g) se colocó en 10 ml de HCl (37% v/v) a 5 °C con agitación rápida y se calentó con incremento paulatino de la temperatura hasta alcanzar los 37 °C. A continuación la suspensión se filtró y se mantuvo a 5 °C con agitación constante durante 1 hora. Posteriormente la suspensión se dejó reposar y las partículas se recogieron en papel filtro Whatman No. 1. Esta quitina se lavó con abundante agua y se secó a 60 °C (quitina ClH).

El siguiente tratamiento se preparó disolviendo 0,1 g de quitina en 100 ml de metanol con 83% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (p/v) y 2% de glucosa (p/v), incorporados poco a poco y con agitación constante durante 24 h. El solvente se eliminó por decantación y la quitina se lavó con abundante agua destilada y se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 30 min (Win y Stevens 2001). Seguidamente, la quitina (0,1 g) se suspendió en 10 ml de agua y se trató con ácido fórmico 25% (25 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. El pH de la mezcla se corrigió hasta pH 4,0 con NaOH. Esta quitina se lavó con abundante agua y se secó a 60 °C (quitina MeOH).

El último tratamiento se preparó a partir de la reacción de 30% de solución de NaOH con la quitina a 100 °C durante 1 hora, en una relación líquido a sólido de 10:1. El residuo sólido se lavó con abundante agua y seguidamente se secó a 50 °C (quitina NaOH).

La quitina tratada por estos métodos se sometió a desacetilación. Para ello, a 6,8 mg de quitina (peso seco) se le incorporó enzima quitina-desacetilasa parcialmente purificada (0,15 AU), en un volumen total de 6 ml, y se mantuvo a 50 °C en un incubador orbital (150 rpm) durante 48 horas. Posteriormente se precipitó con NaOH 1M y se lavó repetidas veces con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad.

Soluciones filmogénicas de quitosano

Las soluciones de quitosano (Ch) se prepararon a dos concentraciones: 1% p/p y 3% p/p, solubilizando el biopolímero en una solución de ácido láctico de 0,15 M (Panreac, España) con agitación moderada hasta total disolución a 20 °C. El pH final de las soluciones fue aproximadamente de 3,2. En algunos casos, el pH de las soluciones se corrigió hasta $5,7 \pm 0,2$ con NaOH 2 M (Panreac, España) y con agitación continua en un recipiente cerrado durante 24 h a 45 °C para evitar la evaporación del solvente.

Las soluciones de quitosano con materiales activos se prepararon a partir de quitosano (2% p/p) disuelto en ácido láctico 0,15 M con agitación constante durante 12 h hasta su completa disolución. PCc, PCw, HPch, HPc y CE (1% p/p) también se dispersaron en ácido láctico 0,15 M. La solución control de Ch se obtuvo tras añadir ácido láctico 0,15 M en el quitosano disuelto (1:1 p/p) hasta una concentración final de 1%. Las demás soluciones se prepararon mezclando la solución de quitosano con las soluciones de PCc, PCw, HPch, HPc y CE hasta 0,5% (p/p), respectivamente. La concentración de quitosano, CE y PCc en la solución más compleja (Ch-CE-PCc) fue 1%, 0,5% y 0,5% p/p, respectivamente. Todas las soluciones se trataron mediante ultrasonidos (Qsonica, CT, EEUU) durante 1 min a 100% de amplitud. El pH final de las soluciones fue de 3,2.

Películas

Películas de quitosano

Las películas se obtuvieron tras verter 50 g de la solución (quitosano 1% p/p en ácido láctico 0,15M), en placas rectangulares (144 cm²) (Plexiglas[®] GS Röhm GmbH & Co Kg, Darmstadt, Alemania) y posteriormente se secaron durante 12 h o 24 h a 45 ± 0,8 °C en una estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania). Previo análisis, las películas se acondicionaron en desecadores durante 3 días a 22 °C sobre soluciones saturadas de NaBr, NaCl y BaCl₂ para mantener humedades relativas (HR) del 58 ± 0,2%, 75 ± 0,2% y 90 ± 0,2%, respectivamente.

Las películas de quitosano con materiales activos se prepararon con 25 g de cada solución formadora de película con materiales activos en placas de metacrilato (120 × 120 mm) (Plexiglas[®] GS Röhm GmbH y Co KG, Darmstadt, Alemania). Las placas se secaron en una estufa (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 12 horas a 45 ± 0,5 °C. Todas las películas se acondicionaron a 58,0 ± 0,2% humedad relativa (HR) durante 4 días antes de los análisis.

Películas de agar y de alginato

Para la preparación de las películas monocapa, el agar (Goldagar, Hispanagar, Burgos, España) y el alginato de sodio (Manuel Riesgo, Madrid, España) se disolvieron en agua destilada (1% p/v) a 90 °C y 70 °C, respectivamente. El aceite de Canela (Isabrubotanik, Ambato, Ecuador) se añadió en una proporción del 1% (p/p) y se utilizó glicerol como plastificante (1% p/p). En el caso de las películas de alginato, la reticulación del polímero fue inducida con la adición de CaCl₂ (Panreac, Barcelona, España) a la solución filmógena (7% p/p de alginato de sodio) con

el fin de generar películas insolubles. Las soluciones precursoras de películas se sometieron a ultrasonidos (Q700, Qsonica, CT, EE.UU.) durante 1 minuto con una amplitud del 100%. Posteriormente, las soluciones (50 g) se colocaron sobre placas de metacrilato (12 cm x 12 cm) y se secaron a 45 °C durante 12 h. Antes de realizar los respectivos análisis, las películas se acondicionaron a 20 °C con 58% de humedad relativa (HR) durante 48 h.

Para la preparación de las películas bicapa, el aceite esencial se incorporó únicamente en una capa (la superior). Para la capa inferior, el biopolímero se disolvió en agua destilada como se describió anteriormente (1% p/v). El glicerol se utilizó como plastificante (1% p/p solución filmogénica). Como en el caso de la monocapa de alginato, la reticulación del polímero fue inducida con la adición de CaCl_2 (7% p/p de alginato de sodio) en la solución filmogénica con el objetivo de generar películas insolubles. Las mezclas se agitaron para obtener una buena homogenización. Posteriormente los 25 g de la solución filmogénica se colocaron en placas de metacrilato (12 cm x 12 cm) y se secaron a 45 °C durante 12 h. En cuanto a la capa superior, el método de preparación fue similar al descrito para la capa inferior, con la incorporación de AE de canela al 2% (p/p solución filmogénica) y glicerol al 0,5% (p/p solución filmogénica) como plastificante. La mezcla se trató por ultrasonidos durante 1 min al 100% de amplitud. Después, la solución con el aceite esencial (25 g) se vertió sobre la capa inferior y se secaron a 45 °C durante 12 h. Antes de realizar los respectivos análisis, las películas se acondicionaron a 20 °C con 58% de humedad relativa (HR) durante 48 horas. Asimismo se prepararon películas bicapa de agar y alginato de sodio sin la incorporación de aceite esencial de canela (siguiendo la metodología anterior) como control.

Películas de proteína de aislado de soja y lignina

Para la primera capa se disolvió la proteína de aislado de soja (SPI) (PRO FAM, ADM, Decatur, IL, USA) (4g / 100mL) en agua, a temperatura ambiente, hasta su disolución completa. Además se agregó glicerol (1% w/v) y se ajustó el pH a 8,0 con NaOH 2N, se añadió formaldehído (FA) (0,35 g/100 ml), se agitó durante 10 min y se ajustó el pH hasta 10,5 con NaOH 2N. Simultáneamente se preparó una solución de lignina (Protobind 1000, Granit R & D SA, Lausanne, Suiza) en agua destilada a una concentración final en la solución filmogénica de 0,6% (p/v). La mezcla se agitó a 40 °C durante 15 min y se alcalinizó a pH = ~11,0 para obtener una mezcla totalmente soluble. Posteriormente, las dos soluciones obtenidas se mezclaron y 25 mL de la mezcla final se extendió sobre una placa de plexiglás ($\varnothing = 12 \times 12 \text{ cm.}^2$) y se secó a 45 °C en una estufa de aire forzado (Bind FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 6 h. Para la preparación de la segunda capa se siguió el mismo procedimiento, sustituyendo el plastificante

(glicerol) por el aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*, Isabrubotanik S.A, Ambato-Ecuador) al 3% (p/p), que se homogeneizó con un Ultra-Turrax (T25, IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen, Alemania) durante 3 min a 17500 rpm. Seguidamente, se adicionó la solución de lignina con agitación magnética para evitar la formación de burbujas. La solución filmogénica con el aceite esencial fue vertida lentamente sobre la primera capa y se secó 45 °C en una estufa (Binder FD 240, Tuttlingen, Alemania) durante 6 h. Estas películas se denominaron SLC. La segunda capa de las películas control (sin AE) se prepararon siguiendo el método ya descrito con la adición de glicerol en 1% p/v en lugar del AE. Estas películas se denominaron SL. Las películas bicapa resultantes (SL y SLC) se acondicionaron en una solución saturada de KBr (58% RH) durante 3 días previo análisis.

Propiedades reológicas y viscosidad

Viscosidad de las soluciones de quitosano

La viscosidad de las soluciones se determinó a 25 °C utilizando un reómetro Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK) con una geometría cono-plato (ángulo de cono 4°, gap 0,15 mm), a una velocidad de cizalla constante de 0,5 s⁻¹. Los resultados son el promedio de cinco determinaciones y se expresaron en mPa·s.

Propiedades viscoelásticas de las soluciones de quitosano

El análisis viscoelástico dinámico de las soluciones de quitosano se llevó a cabo utilizando un reómetro Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido) con una geometría cono-placa (ángulo de cono de 4 °, abertura de 0,15 mm). Se evaluaron las muestras a través de un barrido dinámico de frecuencias a 5, 20 y 40 °C con una amplitud de oscilación del 0,2% en el intervalo de frecuencias entre 0,1-10 Hz. El módulo elástico (G' , Pa) y el módulo viscoso (G'' , Pa) se trazaron en función de la frecuencia y el exponente n se calculó a partir de la ecuación de la ley de energía ($G' = \alpha \omega^n$).

El barrido dinámico de temperatura se realizó por calentamiento de las soluciones filmogénicas de 5 a 90 °C a una velocidad de 1 °C/min, frecuencia de 1 Hz y tensión máxima 0,5%. El módulo elástico (G' ; Pa) y el módulo viscoso (G'' ; Pa) se trazaron en función de la temperatura en la rampa de calentamiento. Para cada muestra se realizaron dos determinaciones, con un error experimental menor al 6% en todos los casos.

Propiedades fisicoquímicas

Contenido de agua

El contenido de humedad de las soluciones de quitosano y de las películas se determinó de acuerdo al método descrito por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C., 1995, AOAC, 2002). Para ello se colocó una capsula con tapa durante al menos 1 hora en una estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) a 45 °C. La cápsula tapada se trasladó con ayuda de unas pinzas a un desecador y se dejó enfriar de 30 a 45 min. Transcurrido este tiempo se pesó la cápsula tapada (con una aproximación de 0,1 mg, m_1). Posteriormente se pesó 0,5 g de muestra previamente homogeneizada (m_2) y se llevó a la estufa a 105 °C durante 24 horas. Al retirar la muestra se colocó la tapa, se dejó enfriar en un desecador durante 30-45 min y se pesó (m_3). Este procedimiento se realizó por triplicado.

El contenido de humedad se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Determinación del pH

El pH se analizó con un pHmetro MeterLab pHM 93 (Radiometer Analytical, Dinamarca) homogeneizando 1 mL de muestra en 10 mL de agua destilada o 5 g de muestra sólida con agua destilada (1:2, p/v) a temperatura ambiente durante 5 min. La medida se realizó al menos por quintuplicado.

Actividad de agua

Para el ensayo de actividad de agua, las muestras se colocaron cubriendo toda la superficie del contenedor del equipo labMaster-aw (Novasina, Precisa, Poissy, Francia). En el caso de soluciones filmogénicas se vertieron 5 mL sobre la superficie de las cápsulas de polipropileno (diámetro 40 mm) y en el caso de las películas se recortaron discos circulares del tamaño de la base de las cápsulas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a temperatura constante (25 °C).

Contenido de cenizas

El contenido de ceniza se analizó por triplicado según la AOAC (2002). Para ello se colocó una cantidad conocida de muestras en un horno de mufla a 500 °C hasta carbonizar la muestra.

Contenido de minerales

Las muestras (por triplicado) se prepararon mediante una digestión ácida con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (Panreac) en un recipiente cerrado por microondas (Microwave Digestion LabStation, Milestone Inc. Shelton, EEUU). El contenido mineral de iones de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, manganeso, hierro y cobre se cuantificó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, modelo 5100 PC, Norwalk, Connecticut, EEUU) en módulo llama (acetileno-aire).

Contenido de nitrógeno

El contenido de nitrógeno/proteína de cada muestra se determinó en un analizador LECO FP-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI, EEUU) utilizando el factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25. En el caso de la quitina y el quitosano no se utilizó este factor de conversión.

TVB- N

La determinación del nitrógeno básico volátil total (TVB-N) se llevó a cabo durante el período de conservación mediante el método de (Antonacopoulos y Vyncke, 1989). Los langostinos pelados (10 g) se homogeneizaron con 90 mL de ácido perclórico (6 %) en un Osterizer (a 5000 rpm durante 1 min) para precipitar las proteínas. La mezcla obtenida se filtró a través de un filtro de papel Whatman N^o 1, se lavó con 5 mL de ácido perclórico y se ajustó hasta 100 mL con HClO₄. El filtrado se destiló en un equipo Tecator AB (modelo 1002, Kjeltex Systems, Suecia). El destilado se recogió en ácido bórico (0,3 % p/v) y se valoró con 0,05 moles/L de HCl. Los análisis se realizaron al menos por triplicado y los resultados se expresaron como mg NBVT/100 g de músculo.

Contenido de grasa

El contenido de grasa se determinó (por triplicado) según el método de Bligh y Dyer (1959). La muestra se extrajo con una solución de cloroformo: metanol 1:1. Se aisló la fase orgánica exenta de grasa con un embudo de decantación para separar la fase orgánica que se recogió y se lavó con una solución salina; finalmente ese evaporó para proceder a calcular el contenido total de grasa.

Contenido de glucosa y glicerol

El análisis de glucosa y glicerol en el concentrado PCc se llevó a cabo por triplicado mediante cromatografía iónica en un equipo Bioscan 817 (Metrohm AG, Suiza) equipado con un detector

amperométrico de pulsos (PAD) con electrodo de oro. La columna empleada fue una Metrosep Carb (1-250/250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula). El concentrado PCc se diluyó en agua (4% p/v), con agitación durante 30 min y se filtró a través de un papel de filtro Whatman Nº 1 y a continuación se filtró de nuevo a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm. La muestra se inyectó utilizando un inyector automatizado de muestra (modelo 838 Advanced Sample Processor, Metrohm AG) con una velocidad de flujo de 1 mL/min, utilizando 100 mM de NaOH como fase móvil. La glucosa y el glicerol se identificaron comparando sus tiempos de retención con sus respectivos patrones (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la cuantificación se realizó a partir de la normalización del área de los picos.

Contenido de astaxantina

Las muestras PCc y HPc se sometieron a una extracción con una mezcla acetona/etanol (1/1) en una proporción soluto/solvente de 1/10, y se mantuvieron bajo agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente en completa oscuridad. Tras a recuperación del solvente, la extracción se repitió de nuevo. El solvente orgánico que contenía los carotenoides se evaporó a vacío a temperatura ambiente. La muestra seca se mantuvo en la oscuridad en atmósfera de nitrógeno a -40 °C hasta posterior análisis.

El extracto lipídico rico en carotenoides (CE) y los extractos lipídicos obtenidos de PCc y HPc se diluyeron con hexano hasta un volumen conocido y la absorbancia de los extractos se midió a 470 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 (Beckman Coulter, Indianapolis, EEUU). La concentración de astaxantina se calculó utilizando la ecuación descrita por Britton (1995),

$$\text{Astaxantina (mg)} = A_{470\text{nm}} \times V \times 597/e$$

Donde A es la absorbancia, V es el volumen de la dilución (mL), 597 es el peso molecular de la astaxantina y e es el coeficiente de absorción molar= 125100, valor documentado por Britton (1995) para la astaxantina disuelta en hexano.

Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó por hidrólisis directa en tubos de vidrio sellados al vacío a 110 °C durante 24 h con HCl 6N usando 0,1% de fenol con norleucina (Sigma-Aldrich, Inc.) como patrón interno (Alemán, Giménez, Pérez-Santín, Gómez-Guillén, y Montero, 2011). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados expresados como la media con su desviación estándar, siendo en todos los casos menor al 6%.

Peso molecular viscosimétrico del quitosano

El peso molecular viscosimétrico ($M_{w,v}$) del quitosano se determinó mediante viscosimetría capilar utilizando un viscosímetro Cannon-Fenske (Cannon Instruments Co., Estados Unidos; tamaño 50) a partir de la viscosidad intrínseca experimental $[\eta]$ (mL/g) de quitosano (0,1 g/ dL) disuelto en una solución de ácido acético 0,1 M/ cloruro de sodio 0,2 M. Las medidas se realizaron a 25 °C utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada-Staudinger: $[\eta] = K_m M^\alpha$, donde $K_m = 1,81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}$ y $\alpha = 0,93$ (Roberts y Domszy, 1982). Para el cálculo se realizó el promedio de cuatro repeticiones.

Solubilidad del quitosano

Para la determinación de la solubilidad se mezclaron 100 mg de quitosano con 5 mL de ácido láctico 0,15 M. La mezcla se agitó con ayuda de un vortex y se dejó en reposo durante 24 horas. Una completa solubilidad se caracteriza por la formación de una solución transparente; el resultado es visual y se expresa como quitosano soluble (afirmación o negación).

Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El espectro infrarrojo entre 4000 y 650 cm^{-1} se obtuvo utilizando un equipo Perkin Elmer Spectrum 400 espectrofotómetro de infrarrojo (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA) equipado con un accesorio ATR. Cada espectro fue el promedio de 32 barridos a una resolución de 4 cm^{-1} . El espectro base fue sustraído utilizando el software del equipo Spectrum version 6.3.2 (Perkin-Elmer Inc.). Las medidas se realizaron a 21 ± 1 °C. Las muestras se colocaron sobre la superficie del cristal ATR y se presionaron con el punzón plano hasta que el espectro estuvo estable y con picos fácilmente diferenciables. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Grado de desacetilación

El grado de desacetilación se determinó por FTIR, considerando la banda del -OH a 3450 cm^{-1} como referencia, el contenido de grupos acetilo (%) se determinó a partir de la relación de absorbancias: $(A_{1655} \text{ cm}^{-1}/A_{3450} \text{ cm}^{-1})100/1,33$. El grado de desacetilación se obtuvo por diferencia, considerando el 100% de acetilación en la quitina (Miya, Iwamoto, Yoshikawa y Mima, 1980; Moore y Roberts, 1980; Domard y Rinaudo, 1983; Khan, Peh, y Ch'ng, 2002).

Actividad antioxidante

Las muestras liofilizadas (PCc, PCw, HPch, HPc) y el extracto de carotenoides (CE) se suspendieron en agua destilada, se agitaron durante 30 min en un agitador orbital (IKA HS 501 Labortechnik Staufen, Germany) y se filtraron a través de un papel filtro Whatman Nº 1. Las películas se disolvieron en agua destilada y se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea y se filtraron a través de papel Whatman Nº 1. La actividad antioxidante de las películas bicapa de agar y alginato de sodio se determinó durante 72 h en agua a 4 °C y 20 °C después de 0,25, 0,5, 0,75, 1,5, 3, 6, 9, 24, 36, 48 y 72 h.

Capacidad de captura de radicales por ABTS

La capacidad de captura de radicales del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se determinó según el método descrito por Alemán *et al.*, (2011). Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (mg/g o L de muestra), basados en una curva patrón de calibración de vitamina C. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Poder reductor del hierro (FRAP)

El poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) se llevó a cabo según el método de Alemán *et al.*, (2011). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ equivalente/g o L de muestra en base a una curva patrón de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó mediante espectrofotometría con el reactivo de Folin Ciocalteau usando como estándar ácido gálico, según modificación al método de Slinkard y Singleton, (1977). Una alícuota de 10 μL de la muestra (en el caso de películas se disolvieron en agua destilada y se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea) se mezcló con 750 μL de agua destilada y se oxidó con 50 μL de reactivo de Folin Ciocalteau. La reacción se neutralizó con 150 μL de solución de carbonato sódico y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución resultante (coloración azul) se midió a 765 nm (UV-1601, modelo CPS-240, Shimadzu, Kioto, Japón). Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GA) mg/g de muestra. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Caracterización de películas

Espesor

El espesor se midió con un micrómetro (MDC-25M, Mitutoyo, Kanagawa, Japón) en 4-6 localizaciones elegidas al azar, en 15 películas como mínimo.

Microestructura

La estructura de las películas (Ch-F y ChPCc-F) se observó mediante tres métodos ópticos: las imágenes de la superficie se obtuvieron con un estereomicroscopio (Estereomicroscopio Zoom L2S8 APO, Leica Microsystems, Suiza), un microscopio óptico Nikon (AFX-IIA), equipado con una cámara (mod. FX35W Nikon Corporation, Japón) y microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (*cryo*-SEM) (Oxford CT1500 Cryosample, Oxford Instruments, Oxford, Inglaterra). Esta última técnica se utilizó para examinar la sección transversal representativa de las películas; las muestras se montaron con la técnica de tomografía de coherencia óptica (OCT compuesto Gurr[®]), fijadas mecánicamente sobre el contenedor y crio-fracturadas tras el montaje, según lo descrito por Gómez-Guillén, Bifani, Silva y Montero (2007).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis calorimétrico de las películas se realizó en un calorímetro diferencial (DSC) modelo TA-Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos) previamente calibrado con indio de alta pureza (punto de fusión, 156,4 °C; entalpía de fusión, 28,44 J/g). Las muestras (10-15 mg \pm 0,002 mg de película, aproximadamente) se pesaron en una balanza electrónica (modelo ME235S Sartorius, Goettingen, Alemania) y después se encapsularon en recipientes herméticos de aluminio. Como referencia se utilizó una cápsula vacía. Las muestras se analizaron bajo atmósfera de nitrógeno seco (50 mL/min), entre 5 y 400 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura máxima (T_{pico} , °C) y la entalpía de desnaturalización (ΔH) se determinaron al menos por triplicado. Los datos se normalizaron al contenido de materia seca (J/g_{MS}) después de la desecación de cada cápsula. Las muestras se secaron en sílice previo análisis.

Propiedades mecánicas

Las pruebas de resistencia y de punción se realizaron con un analizador de textura TA.XT2 plus (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) controlado por el *Software Texture Exponent* (Texture Technologies and by Stable Micro Systems, Ltd., Scarsdale, NY, USA). Las películas se

cortaron en rectángulos (100 mm × 20 mm) según el método descrito por Blanco-Pascual, Martín Fernández y Montero, (2013). La resistencia (TS , MPa) y elongación en la rotura (EAB , %), se determinaron a partir de las curvas obtenidas al representar la tensión vs la deformación en el punto de rotura, y el módulo elástico o módulo de Young (Y , MPa) se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva.

La prueba de punción se realizó con películas de 100 × 100 mm fijadas en una celda de 35 mm de diámetro hasta el punto de rotura, utilizando un émbolo redondeado (5 mm) de acero inoxidable a una velocidad de 100 mm/min. La fuerza de rotura (F , N) y el punto de rotura (D , %), se determinaron según Sobral, Menegfali, Hubinger y Roques (2001). El ensayo se llevó a cabo al menos por triplicado a temperatura ambiente y manteniendo las muestras al 58% de humedad relativa hasta el inicio del ensayo.

Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó, al menos por triplicado, siguiendo el método descrito por Sobral *et al.*, (2001) a 21 ± 1 °C en un desecador con agua destilada (100% RH). Las muestras se pesaron cada hora, al menos durante 7 h. La permeabilidad al vapor de agua se calculó siguiendo la ecuación: $w \cdot x \cdot t^{-1} \cdot A^{-1} \cdot \Delta P^{-1}$, donde w es el peso ganado (g), x es el espesor de la película (mm), t es el tiempo (h), A es el área de película expuesta (cm²) y ΔP es la diferencia de presión parcial de vapor entre la atmósfera y el gel de sílice (2642 Pa a 22 °C). Los resultados se expresaron en g mm h⁻¹ cm⁻² PA⁻¹.

Solubilidad de las películas

Para la prueba de solubilidad en agua, las películas comestibles se cortaron en forma de círculo de 40 mm de diámetro y se colocaron en recipientes de plástico con 50 mL de agua destilada, a 22 °C durante 24 h. La solución resultante se filtró a través de papel filtro Whatman Nº 1 para recuperar el residuo de la película sin disolver, que seguidamente se desecó a 105 °C durante 24 h. La solubilidad película FS (%) se calculó mediante la expresión $[(W_o - W_f) / W_o] \times 100$, donde W_o es el peso inicial de la película expresada como materia seca y W_f es el peso del residuo desecado sin disolver de la película. El análisis se realizó al menos por triplicado.

Resistencia al agua

La resistencia al agua se determinó siguiendo el método descrito por Blanco Pascual *et al.*, (2013). Las películas se fijaron a células calibradas (área 15,90 cm²) y después se colocaron en desecadores con agua destilada (100% HR). A continuación se vertió agua destilada (5 mL)

sobre la superficie de la película y se registró la deformación de la película debido al efecto del agua (cm), el tiempo en que el agua comienza a filtrarse a través de la película y el tiempo que tarda la película en romperse. Todas las pruebas se llevaron a cabo al menos por triplicado.

Color

Los parámetros de color, L^* (luminosidad), a^* (rojo/verde) y b^* (amarillo/azul) se midieron con un colorímetro Konica Minolta CM - 3500 d (Konica Minolta, Madrid, España), un iluminador D65 (luz natural) y observador estándar D10. Las medidas se realizaron en 5 zonas diferentes de la película y cada valor fue el promedio de las medidas de al menos 15 películas.

Barrera a la luz y transparencia

Las propiedades de barrera a la luz se determinaron utilizando un espectrofotómetro UV-1601 (modelo CPS-240, Shimadzu, Kyoto Japón) a las longitudes de onda de 200 a 800 nm. Las películas se cortaron con forma rectangular y se colocaron directamente en la celda de prueba del espectrofotómetro, utilizando una celda vacía como referencia. La transparencia (%T) se calculó siguiendo el método descrito por Ifuku *et al.*, (2007). Las medidas se realizaron al menos por triplicado.

Actividad antimicrobiana

Actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco

La actividad antimicrobiana de las soluciones y películas de quitosano se determinó por el método de difusión en disco en placa de agar frente a 26 microorganismos como se describió anteriormente (Giménez *et al.*, 2012). Brevemente, los discos de papel de 5mm de diámetro se impregnaron con 40 μ L de la solución filmogénica, o bien se utilizaron discos de 5 mm de diámetro obtenidos de cada película. En ambos casos, los discos se colocaron directamente sobre la superficie de la placa de agar previamente inoculada con el microorganismo en cuestión (10^5 - 10^6 UFC/mL). Los microorganismos se seleccionaron por su importancia en la salud (como probióticos o patógenos) o por ser responsable del deterioro de los alimentos y se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos (CECT): *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Aspergillus niger* CECT 2088, *Bacillus cereus* CECT 148, *Bacillus coagulans* CECT 56, *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* DSMZ 10140, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215, *Brochothrix thermosphacta* CECT 847, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Clostridium perfringens* CECT 486, *Debaryomyces hansenii* CECT 11364, *Enterococcus faecium* DSM 20477, *Escherichia*

coli CECT 515, *Fusarium oxysporum* CECT 2867, *Lactobacillus acidophilus* CETC 903, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075, *Listeria innocua* CECT 910, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Penicillium expansum* DSMZ 62841, *Photobacterium fosfóreo* CECT 4192, *Pseudomonas aeruginosa* , CECT 110, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Shigella sonnei* CECT 4887, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Vibrio parahemolítico* CECT 511T, *Yersinia enterocolitica* CECT 4315. Después de la incubación se observó el crecimiento microbiano con ayuda del software Corel Photo-Paint X3. El diámetro de inhibición se consideró como medida de la actividad antimicrobiana. El grado de inhibición se expresó de la siguiente manera: +++: totalmente inhibido, ++: parcialmente inhibido, +: ligeramente inhibido; - sin inhibición. En otros casos los resultados se expresaron como diámetro de inhibición del crecimiento (mm), incluyendo el diámetro del disco. Cada determinación se realizó por duplicado en todos los ensayos.

Además del diámetro de inhibición, en el ensayo con películas de quitosano y concentrado lipoproteico, también se estableció la actividad antimicrobiana circunscrita al área ocupada por la película en contacto con la placa de agar previamente inoculada. Así, después de la incubación, 1 g de la superficie del agar en contacto con la película comestible se recogió cuidadosamente y se colocó en un tubo estéril con 9 ml de agua de peptona tamponada (0,1 g/100 ml de agua) y se agitó durante 1 min con la ayuda de un vortex dentro de un cabina de flujo laminar vertical (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, España). Una vez realizadas las diluciones apropiadas, las placas se sembraron en superficie en PCA (Plate Count Agar, Oxoid, Basingstoke, UK) y se incubaron a la temperatura adecuada. El recuento final se llevó a cabo después de 48 horas. Cada determinación se realizó por duplicado.

Ensayos de conservación

Para determinar la capacidad antimicrobiana de los recubrimiento durante la conservación, los langostinos se pelaron asépticamente, se pesó 10 g de alimento (parte comestible) y se transfirió a bolsas estériles (Sterilin, Piedra, Staffordshire, Reino Unido), con 90 mL de agua de peptona 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), que se agitaron vigorosamente durante 1 minuto en un homogeneizador Stomacher (modelo Colworth 400, Seward, Londres, Reino Unido). Posteriormente se prepararon las diluciones apropiadas para la determinación de los siguientes microorganismos: (i) recuento de bacterias totales (TBC) en placas de agar hierro (Scharlab, Barcelona, España) con 1% de NaCl, que se incubaron a 15 °C durante 3 días, (ii) organismos productores de H₂S, como colonias negras, en placas de agar hierro que se incubaron a 15 °C durante 3 días, (iii) bacterias luminiscentes en placas de agar hierro con 1 %

NaCl incubadas a 15 °C durante 5 días, (iv) aerobios mesófilos viables en agar para recuento en placa PCA (Oxoid) que se incubaron a 30 °C durante 72 h, (v) *Pseudomonas* spp., en placas de agar base para *Pseudomonas* (Oxoid) con suplemento para *Pseudomonas* spp. CFC (Cetrimida, Fucidine, Cefalosporina) (Oxoid) incubadas a 25 °C durante 48 h; (vi) Enterobacteriaceae en doble capa de agar bilis rojo violeta (VRBG, Oxoid) que se incubaron a 30 °C durante 48 h, (vii) bacterias lácticas en doble capa de agar MRS agar (Oxoid) incubadas a 30 °C durante 72 h, (viii) agar glucosa-extracto de levadura cloranfenicol YGC (Oxoid) que se incubaron a 35 °C durante 24 h para la enumeración de mohos y levaduras. Todos los recuentos se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC/g). Todos los análisis se realizaron por duplicado. Los días de aplicación de los recubrimientos en los alimentos correspondientes se consideró como día cero (0)..

Inoculación con *Listeria monocytogenes*

Para determinar el efecto antimicrobiano de los recubrimientos, los langostinos crudos y pelados se inocularon con *L. monocytogenes* (CECT 4032) a una concentración de 10^3 a 10^4 UFC/g. La enumeración de *L. monocytogenes* se realizó en placas de agar cromogénico chromID™ (BioMerieux, Madrid, España),, y confirmación por Lmono Rapidec® (BioMerieux). En muchos casos las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los recuentos se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC/g). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El día de la inoculación se tomó como el día cero (0).

Análisis sensorial

Evaluación sensorial

Para juzgar los cambios en los alimentos debidos a la aplicación de los recubrimientos se realizó una prueba sensorial con un panel de catadores compuesto por diez panelistas semi - entrenados que probaron las muestras siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE. Durante todo el período de conservación, los panelistas evaluaron la apariencia de la muestra con algunas modificaciones al método descrito por López-Caballero, Martínez-Álvarez, Gómez- Guillén, y Montero, (2007). Los panelistas evaluaron el olor y sabor de acuerdo a una escala hedónica de 0 a 5, donde 0 = típico, característico y 5 = anormal, desagradable. Asimismo, la melanosis se evaluó de acuerdo a una escala de 0 a 5, donde 0 = ausencia de manchas negras y 5 = manchas por todo el langostino. Todos los alimentos sufrieron algún tratamiento térmico como paso previo a la evaluación del sabor.

Prueba triangular

Se realizó una prueba triangular (UNE 87 006 92) para evaluar los posibles cambios producidos en los alimentos con la aplicación de recubrimientos. Diez panelistas semi-entrenados probaron las muestras siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE.

Liberación de compuestos activos

Liberación en agua de cinamaldehído y eugenol

La liberación de cinamaldehído y de eugenol de las películas bicapa de agar y alginato con aceite esencial de canela se determinó durante 72 h en agua, que se considera como un simulador de un alimento acuoso por la legislación europea, tanto a temperatura ambiente (20 °C) como a temperatura de almacenamiento en estado refrigerado (4 °C). Las porciones de las películas bicapa de agar y de alginato de sodio (9 cm²) se colocaron en vasos de precipitados con 15 mL de agua destilada y la fracción de película no disuelta se retiró del agua a distintos intervalos de tiempo. La solución restante se filtró a través de un papel filtro Whatman N °1 y se utilizó para analizar el contenido de cinamaldehído y eugenol liberado de las películas bicapa, así como para evaluar la capacidad antioxidante.

La cantidad de cinamaldehído y eugenol liberada de las películas después de 0,25, 9, 24 y 72 h en agua a 4 °C y 20 °C, se cuantificó mediante cromatografía GC-MS con un sistema Agilent que comprende un cromatógrafo de gases 6890N con un inyector automatizado integrado (Agilent 7683) y un puerto de inyección “split/splitless” acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 (Agilent Technologies, EE.UU.).

Las muestras acuosas se diluyeron con hexano (1:100) y se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 5 minutos. Después de la separación de fases, se añadieron 10 µl del estándar interno (2-octanona en hexano) a 500 µl de la fase orgánica. El volumen de inyección fue de 0,2 µl. La separación cromatográfica se realizó con una columna HP-5MS (30 mx 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor, Agilent Technologies, EE.UU.). La inyección se realizó a 230 °C. Se utilizó helio como gas portador, con un flujo constante de 1 mL/min. El intervalo de temperaturas para el horno fue el siguiente: temperatura inicial 40 °C durante 5 min, posteriormente se aumentó hasta 160 °C a una velocidad de 8 °C/min y finalmente se incrementó hasta 220 °C a razón de 20 °C/min durante 3 min. Se utilizó el modo de ionización de impacto electrónico (EI) con filtro de masas de cuadrupolo. La energía de ionización fue de 70 eV y la línea de transferencia fue de 230 °C. La cuantificación, sin embargo, se llevó a cabo en seguimiento de *iones* seleccionados (SIM) para 2-octanona, cinamaldehído y eugenol. Los

resultados se expresaron como mg de cinamaldehído por g de película y mg de eugenol por g de película, basados en una curva estándar de cinamaldehído y eugenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Liberación de citronelal y geraniol en espacio de cabeza

Los compuestos volátiles liberados de las películas de proteína de aislado de soja, lignina y aceite esencial de citronela se determinaron con la técnica de espacio de cabeza mediante cromatografía de gases-masas, GC-MS (Agilent 6890N GC, sistema acoplado directamente a un MS 5973) con un inyector robotizado de espacio de cabeza “headspace” modelo Turbomatrix HS 40. La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 220 °C. La inyección se realizó por separado con una proporción de 100:1 y el volumen inyectado fue 0,2 µL. Se utilizó helio como gas portador a razón de 1,3 ml/min. El sistema de GC se equipó con una columna capilar HP-5MS (30 mm × 0,25 mm; 0,25 µm de espesor de la película). El programa de temperatura del horno se mantuvo a 45 °C durante los primeros 2 minutos, con incremento hasta 210 °C a una velocidad de 15 °C/min y después hasta 240 °C a una velocidad de 50 °C/min durante 5 min. Los espectros se obtuvieron en modo impacto electrónico con 70 eV y en modo de ión selectivo (SIM). Los resultados de los espectros de masa y tiempos de retención masa y tiempos de retención se determinaron para compuestos estándar. Los iones registrados en modo SIM fueron: Citronelal, m/z 41 y Geraniol, 69 m/z. Estos iones fueron escogidos debido a la abundancia del ion relativo con valores altos de m/z.

Para el ensayo se obtuvieron discos de 5 mm de las películas acondicionadas, tanto a 58% HR como bajo condiciones atmosféricas (EC), se colocaron en un vial de espacio de cabeza sellado herméticamente y se pesaron.

Biodegradación

El ensayo de degradación se llevó a cabo en suelos orgánicos naturales. Las películas de proteína de aislado de soja, lignina y aceite esencial de citronela (12 × 12 cm), previamente acondicionadas en desecadores al 58% RH durante 1, 3 y 6 meses, se colocaron en el suelo a temperatura y humedad ambiental y protegidas de la luz UV, como se indica en Tabla 1. Las películas se regaron cada dos días para simular condiciones de llovizna y a los 30 días se recuperaron, limpiaron y lavado con agua destilada repetidas veces y se secaron a 60 °C en estufa (Binder FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 24 h hasta peso constante. El grado de degradación en las películas se determinó visualmente y siguiendo la ecuación: pérdida de

peso ($W_{\text{pérdida}}$) = $(W - W_f) / W \times 100$ fueron, donde, W y W_f es el peso de la película antes y después de la prueba de degradación en el suelo.

Tabla 1. Temperatura (máxima y mínima) y humedad media en Madrid (España) durante los meses de enero a agosto del 2013 (AEMET 2013).

Parámetros	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Temperatura Máxima (°C)	10,66 ± 0,56	11,03 ± 1,37	12,98 ± 2,82	17,75 ± 0,25	20,64 ± 1,16	28,21 ± 0,51	34,22 ± 2,12	33,90 ± 2,2
Temperatura Mínima (°C)	2,66 ± 1,20	2,16 ± 0,54	5,29 ± 0,89	7,34 ± 1,14	8,68 ± 1,12	13,89 ± 0,31	20,35 ± 2,75	19,88 ± 2,58
Humedad relativa (%)	79,91 ± 11,86	70,94 ± 12,97	80,05 ± 10,09	65,78 ± 14,02	59,26 ± 17,64	44,63 ± 17,22	34,41 ± 15,03	35,34 ± 15,22

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se muestran como el valor medio ± la desviación estándar. Para estudiar el efecto de las variables se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías según los experimentos, tal como se detalla en cada Capítulo de la Memoria. En caso de detectarse diferencias se realizó un análisis de comparaciones múltiples mediante el test de Tukey o Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p \leq 0,05$.

El análisis estadístico se realizó mediante los programas informáticos SPSS® (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, EEUU) y GraphPad Prism 5,0 (GraphPad Software, San Diego California, EEUU).

VI. Trabajo experimental

- 1. Valorización de los residuos de la industria procesadora de crustáceos y obtención del material polimérico y activo, principalmente quitosano, proteínas, lípidos y carotenoides, mediante métodos respetuosos con el medio ambiente y manteniendo su funcionalidad.**

El objetivo de este estudio fue la obtención y caracterización de un material polimérico, como el quitosano, mediante diferentes procesos de obtención. En primer lugar se evaluó el efecto de eliminar la etapa de desproteinización (sin la obtención de quitina como etapa intermedia), adición de un agente reductor (para proteger la cadena polimérica) y distintos tiempos de desacetilación (Capítulo 1 de la presente Memoria). Si bien el método es efectivo, no se obtiene una completa recuperación de proteínas y carotenoides. Por ello, se planteó optimizar el proceso incorporando extracciones enzimáticas (Viscozyme y Alcalasa) con las que se obtuvo quitosano (Ch40) y material activo de naturaleza proteica (PCc), así como carotenoides, que se caracterizaron en base a sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas (Capítulo 2).

Con el fin de profundizar en la búsqueda de procesos de extracción respetuosos con el medio ambiente, se plantearon dos métodos de desacetilación: un método biológico y un método químico suave. El método biológico evaluó la posibilidad de utilizar un extracto crudo de quitina-desacetilasa (enzima microbiana obtenida a partir de los mohos *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*) durante la desacetilación de la quitina (Capítulo 3). El método químico suave se basa en la disminución del consumo de compuestos químicos. Para llevarla a cabo se optimizó el proceso de desacetilación (referido en el Capítulo 2) con el fin de reducir el consumo de NaOH en un 80% en peso durante el proceso y así obtener quitosano (Ch10) (Capítulo 4).

- 2. Diseño y desarrollo de recubrimientos con el material obtenido de los residuos de crustáceos y caracterización de sus propiedades tecnológicas y activas.**

En este trabajo se desarrollaron soluciones filmogénicas con los diversos quitosanos y material activo (concentrados e hidrolizados lipoproteicos y carotenoides) y se caracterizaron en base a sus propiedades fisicoquímicas y activas, tanto antioxidantes (FRAP, ABTS, fenoles totales)

como antimicrobianas (Capítulo 2, 4 y 5 para los biopolímeros y Capítulo 2 para el material activo).

El concentrado lipoproteico (PCc) se eligió como ingrediente activo en la formulación de soluciones filmogénicas, coberturas y películas de quitosano por su actividad antioxidante y antimicrobiana. Los quitosanos Ch40 y Ch10 se seleccionaron como matriz polimérica para diseño y desarrollo de recubrimientos. (Capítulos 2, 4 y 5).

3. Aplicación de recubrimientos de quitosano y extractos lipoproteicos de crustáceos a productos de la pesca y acuicultura durante la conservación en estado refrigerado

En esta sección se valoró la aplicación alimentaria de un recubrimiento obtenido en el apartado anterior. Para ello, se seleccionaron como ejemplo langostinos (*Litopenaeus vannamei*) que se recubrieron con una cobertura en base a quitosano (Ch10) con la incorporación de concentrado lipoproteico (PCc), en los que se evaluó la calidad microbiológica y sensorial (incluyendo melanosis) durante la conservación en refrigeración (Capítulo 5).

4. Diseño y desarrollo de recubrimientos en bicapa a partir de agar o de alginato con la incorporación de aceites esenciales, caracterización de sus propiedades y su aplicación en alimentos.

En este apartado se pretende desarrollar películas que permitan la difusión de los compuestos activos del aceite esencial sin modificar las propiedades sensoriales del alimento. En este estudio el aceite esencial de canela se seleccionó como ingrediente activo por ser un efectivo antimicrobiano y por su flavor delicado. Las matrices se diseñaron en base a alginato y agar porque permiten la liberación de los compuestos activos. La estrategia tecnológica que se planteó fue el diseño de películas en bicapa, donde el aceite esencial se incluyó en la capa más externa. Se evaluó la capacidad de liberación de compuestos activos mediante la determinación de la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) y antimicrobiana.

Para determinar la actividad de las películas frente a microorganismos patógenos se seleccionó a *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria se inoculó a langostinos crudos que se recubrieron con películas en bicapa para establecer su papel durante la conservación en refrigeración. Además

se estudió el efecto de la película bicapa y el tipo de polímero utilizado sobre las propiedades sensoriales de langostinos (*L. vannamei*) (Capítulo 6).

5. Diseño y desarrollo de películas en bicapa de proteína de soja, lignina y aceites esenciales con actividad insecticida y fungicida para su aplicación en agrocultivos y evaluación de su estabilidad y biodegradabilidad.

En este apartado se persigue el desarrollo de una película activa (con propiedades insecticida y antifúngica) que sea capaz de mantener su integridad en el tiempo en condiciones ambientales y que a su vez se degrade en un periodo relativamente corto. Las películas en bicapa (Capítulo 6), sentaron las bases para aplicar aceites esenciales sin generar cambios en las propiedades sensoriales de los alimentos. En este trabajo se desarrollaron películas en bicapa en base a proteína de aislado de soja (SPI) reticulada con formaldehído, con la incorporación de lignina y aceite esencial de clavo y citronela. Estos materiales dieron lugar a películas con buenas propiedades antioxidantes y de barrera, tanto al agua como a la luz y que además, tras la incorporación de los aceites esenciales, sus propiedades activas antimicrobianas e insecticidas permanecieran en el tiempo.

Las películas se sometieron a un bioensayo para determinar la capacidad insecticida y repelente contra la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), responsable del ataque a cultivos (Capítulo 7).

La actividad antimicrobiana de las películas en bicapa desarrolladas a partir de dicha formulación, en aras de una potencial aplicación en la industria bananera, se evaluaron frente al moho *Fusarium oxysporum*, patógeno específico para este fruto (Capítulo 8). Asimismo se estudió la biodegradabilidad de estas películas una vez que se desechan al ambiente. (Capítulo 8).

Capítulo 1. Efecto del acondicionamiento en las propiedades antimicrobianas y reológicas de películas de quitosano

Resumen

La actividad antimicrobiana de 8 quitosanos con diferente peso molecular y grado de desacetilación se ensayó frente a 26 microorganismos. El estado físico del quitosano fue un factor importante en la actividad antimicrobiana. Como solución, el quitosano inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo la más sensible *Debaryomyces hansenii*. La actividad antimicrobiana más elevada corresponde a quitosanos con diferente peso molecular y grado de desacetilación similar (ChR2: 2200 kDa, 81% GD y ChR4: 830 kDa, 83% GD). Las películas obtenidas a partir de estos dos quitosanos mostraron mayor actividad cuando su estado físico se asemejó a una cobertura, con mayor contenido de agua, permitiendo la difusión de los grupos amino. La actividad antimicrobiana se incrementó a pH ácido. Por otro lado, los quitosanos tuvieron un comportamiento reológico típico de un fluido newtoniano, característica que permite utilizar los quitosanos en solución a modo de cobertura. El quitosano ChQ4 (1600 kDa, 82% GD), además presentó la mayor fuerza de gel, lo que facilitaría su adherencia. Todo ello lo convierte en un potencial candidato para el desarrollo de recubrimientos resistentes y antimicrobianos.

Palabras clave: quitosano, estado físico, antimicrobiano, reología.

Introducción

Una de las aplicaciones de los polímeros naturales en la actualidad se basa en el desarrollo de envases más respetuosos con el medio ambiente, lo que ayuda a reducir la contaminación causada por material no biodegradable. Debido a sus propiedades únicas, incluyendo biodegradación, biocompatibilidad y no-toxicidad (Dash, Chiellini, Ottenbrite, y Chiellini, 2011), el quitosano ha despertado gran interés industrial en los últimos años.

El quitosano disuelto en soluciones ácidas da lugar a soluciones viscosas. La viscosidad determina el grado de penetración que tendrá el quitosano y además, en solución es susceptible de formar hidrogeles y tener un comportamiento viscoelástico. Éste comportamiento a su vez está gobernado por el tamaño de la molécula, longitud de la cadena y por lo tanto del peso molecular (Chattopadhyay e Inamdar, 2011). La capacidad de bioadhesión de los hidrogeles y la naturaleza catiónica del quitosano le permiten formar recubrimientos altamente adherentes, especialmente cuando se trata de soluciones de quitosano de alta viscosidad (Yamada *et al.*, 2000). Además, el efecto antibacteriano del quitosano lo hace especialmente útil para el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos

(Dutta, Tripathi, Mehrotra, y Dutta, 2009; Zhong, Song, y Li, 2011). La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido ampliamente referida en la literatura y representa una alternativa factible para la aplicación como agente bactericida. Si bien el mecanismo de acción no es totalmente conocido, se especula que puede estar asociado a cambios en la permeabilidad de la célula debido a la carga del quitosano y la carga característica de la superficie de la pared celular bacteriana (Devlieghere, Vermeulen, y Debevere, 2004). Algunos estudios demuestran que el efecto antimicrobiano del quitosano depende del peso molecular (\overline{M}_η) y el grado de desacetilación (GD) (Zheng y Zhu, 2003). El ácido en el cual se disuelve el quitosano, así como el acondicionamiento (en términos de humedad relativa HR, pH, etc.) de la solución formadora de película, también pueden influir en la interacción entre los componentes de la película (Bégin y Van Calsteren, 1999; Leceta, Guerrero, y de la Caba, 2013).

El quitosano se produce principalmente a partir de los exoesqueletos de crustáceos básicamente en cuatro etapas: desmineralización, desproteización, decoloración y desacetilación. Si bien este proceso de extracción es ampliamente utilizado, Alvarado *et al.*, (2007) desarrollaron un método en el que se eliminan las etapas de desproteización y decoloración. El quitosano así obtenido presenta un mayor peso molecular y grado de desacetilación, excelentes propiedades filmogénicas y capacidad formadora de películas comparables con el quitosano obtenido de manera tradicional y además resulta menos costoso al eliminar alguna de las etapas. Lalaleo, (2010) presenta una variación al método anterior e incluye un agente reductor (NaBH_4) en la etapa de desacetilación durante 2 o 4 horas. Sin embargo, no existen datos de la caracterización de los quitosanos obtenidos por estos métodos más allá del grado de desacetilación y el peso molecular.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del peso molecular (\overline{M}_η) y grado de desacetilación (GD, %) sobre el potencial filmogénico y antimicrobiano de recubrimientos de quitosano con diferentes acondicionamientos.

Materiales y Métodos

Materia prima

Los ocho quitosanos se obtuvieron a partir de caparazones de langostino (*Litopenaeus vannamei*) según los métodos descritos por Lalaleo, (2010). Estos métodos básicamente constan de dos procedimientos: uno que consiste en la obtención de quitina y otro que evita esta etapa.

Capítulo 1. Efecto del acondicionamiento en las propiedades antimicrobianas y reológicas de películas de quitosano

La obtención de quitosano (Ch) con el paso previo de obtención de quitina se llevó a cabo mediante la desproteinización de los caparazones de langostino con 0,5% NaOH p/v (0,125 M) a 80 °C durante 30 minutos; el sólido remanente se lavó con abundante agua hasta llegar a un pH cercano a la neutralidad. Después se realizó una segunda desproteinización con 3% NaOH p/v (0,75 M) a 80 °C durante 10 minutos, proceso que se ejecutó por triplicado. La eliminación del contenido mineral se realizó con HCl 2M en una relación 1:3 (v/v) a temperatura ambiente durante 60 minutos. La quitina obtenida se lavó hasta llegar a pH neutro y se secó en una estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) a 50 °C durante 6 horas. Inicialmente la desacetilación alcalina de quitina (Q) se realizó con 50% NaOH (p/v) a 100 °C con una modificación al método descrito por Alvarado *et al.*, (2007) mediante la adición o no de NaBH₄ como agente reductor (R), a una concentración de 0,83 g/L, y un tiempo de desacetilación de 2 ó 4 horas. El quitosano se lavó hasta llegar a la neutralidad y se secó en estufa a 50 °C durante 6 horas.

Para la producción de quitosano sin la obtención previa de quitina (Alvarado *et al.*, 2007), los caparazones de langostino se desmineralizaron directamente con HCl 2 M durante 72 horas. La desacetilación alcalina de los caparazones se realizó con 50% NaOH (p/v) a 100 °C mediante la adición o no de NaBH₄ como agente reductor a una concentración de 0,83 g/L y un tiempo de desacetilación de 2 ó 4 horas. El quitosano se lavó hasta alcanzar la neutralidad y se secó en estufa a 50 °C durante 6 horas. En la Tabla 1 se describen los códigos de los diferentes quitosanos obtenidos.

Tabla. 1 Tratamientos y códigos de los diferentes quitosanos obtenidos.

Quitosano	Paso por Quitina	Agente reductor NaBH ₄	Tiempo h
ChQ2	Q		2
ChQ4	Q		4
ChQR2	Q	R	2
ChQR4	Q	R	4
Ch2	-		2
Ch4	-		4
ChR2	-	R	2
ChR4	-	R	4

Peso molecular viscosimétrico del quitosano

El peso molecular viscosimétrico (\overline{M}_η) del quitosano se determinó mediante viscosimetría capilar utilizando un viscosímetro Cannon-Fenske (Cannon Instruments Co., Estados Unidos;

tamaño 50) a partir de la viscosidad intrínseca experimental $[\eta]$ (mL/g) de quitosano disuelto en una solución de ácido acético 0,1 M/ cloruro de sodio 0,2 M. La concentración inicial del quitosano fue de 1% p/v en todos los casos y se prepararon 4 diluciones. Las medidas se realizaron a 25 °C utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada-Staudinger: $[\eta] = K_m \overline{M}_\eta^\alpha$, donde $K_m = 1,81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}$ y $\alpha = 0,93$ (Roberts y Domszy, 1982). Para el cálculo se realizó el promedio de cuatro repeticiones.

Grado de desacetilación

El grado de desacetilación se determinó por FTIR utilizando un equipo Perkin Elmer Spectrum 400 espectrofotómetro de infrarrojo (Perkin–Elmer Inc., Waltham, MA, USA) equipado con un accesorio ATR, de acuerdo al método descrito por Moore y Roberts, (1980). Considerando la banda del –OH a 3450 cm^{-1} como referencia, el contenido de grupos acetilo (%) se determinó a partir de la relación de absorbancias: $(A_{1655} \text{ cm}^{-1}/A_{3450} \text{ cm}^{-1}) \cdot 100/1,33$. El grado de desacetilación se obtuvo por diferencia, considerando el 100% de acetilación en la quitina.

Solubilidad del quitosano

Para la determinación de la solubilidad, 100 mg de quitosano se mezclaron con 5 mL de ácido láctico 0,15 M, se agitó con ayuda de un vortex y se dejó en reposo durante 24 horas. La solubilidad completa se caracteriza por la formación de una solución transparente; el resultado es visual y se expresa como quitosano soluble (afirmación o negación).

Preparación de las soluciones de quitosano

Las soluciones de quitosano se prepararon en dos concentraciones: 1% (p/p) (FS1) y 3% (p/p) (FS3), solubilizando el biopolímero en una solución de ácido láctico de 0,15 M (Panreac, España) con agitación moderada durante 1 h a 20 °C. El pH de las soluciones fue corregido hasta $5,7 \pm 0,2$ con NaOH 2 M (Panreac, España) y con agitación continua en un recipiente cerrado durante 24 h a 45 °C para evitar la evaporación. Para comparar la actividad antimicrobiana en medio ácido, se prepararon soluciones de quitosanos (ChQ4, ChR2 y ChR4) en ácido láctico 0,15 M con un pH final de $3,2 \pm 0,2$.

Preparación de las películas de quitosano

Las películas se obtuvieron tras verter 50 g de las soluciones (quitosano 1% p/p) en ácido láctico 0,15M), en placas rectangulares (144 cm^2) (Plexiglas® GS Röhm GmbH y Co Kg, Darmstadt, Alemania) y posteriormente se secaron durante 12 h o 24 h a $45 \pm 0,8$ °C en una

estufa de convección por aire forzado (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania). Previo análisis, las películas se acondicionaron en desecadores durante 3 días a 22 °C sobre soluciones saturadas de NaBr, NaCl y BaCl₂ para mantener humedades relativas (HR) del 58 ± 0,2%, 75 ± 0,2% y 90 ± 0,2%, respectivamente.

Contenido y actividad de agua

El contenido de humedad de las soluciones de quitosano y las películas se determinó de acuerdo al método descrito por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C, 1995). Para el ensayo de actividad de agua, las muestras se colocaron cubriendo toda la superficie del contenedor del equipo labMaster-aw (Novasina, Precisa, Poissy, Francia). Para ello se vertieron 5 mL de las soluciones filmogénicas y en el caso de las películas se recortaron discos circulares del tamaño de la base del contenedor. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana de las soluciones y películas de quitosano se determinó por el método de difusión en disco en placa de agar frente a 26 cepas microbianas como se describió anteriormente (Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca, y Montero, 2012). Brevemente, los discos de papel de 5mm de diámetro se impregnaron con 40 µL de la solución filmogénica, o bien se utilizaron discos de 5 mm de diámetro obtenidos de cada película. En ambos casos, los discos se colocaron directamente sobre la superficie de la placa de agar previamente inoculada con el microorganismo en cuestión (10⁵-10⁶ UFC/mL). Los microorganismos se seleccionaron por su importancia en la salud (como probióticos o patógenos) o por ser responsable del deterioro de los alimentos y se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Aspergillus niger* CECT 2088, *Bacillus cereus* CECT 148, *Bacillus coagulans* CECT 56, *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* DSMZ 10140, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215, *Brochothrix thermosphacta* CECT 847, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Clostridium perfringens* CECT 486, *Debaryomyces hansenii* CECT 11364, *Enterococcus faecium* DSM 20477, *Escherichia coli* CECT 515, *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075, *Listeria innocua* CECT 910, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Penicillium expansum* DSMZ 62841, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Pseudomonas aeruginosa*, CECT 110, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Shigella sonnei* CECT 4887, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T, *Yersinia enterocolitica* CECT 4315. Después de la incubación se midió el diámetro

de inhibición (considerado la actividad antimicrobiana) con el software Corel Photo-Paint X3. Los resultados se expresaron como diámetro de inhibición del crecimiento (mm), incluyendo el diámetro del disco. Cada determinación se realizó por duplicado.

Propiedades viscoelásticas de las soluciones de quitosano

El análisis viscoelástico dinámico de las soluciones de quitosano se llevó a cabo utilizando un reómetro Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido) con una geometría cono-placa (ángulo de cono de 4 °, abertura de 0,15 mm). Se evaluaron las muestras a través de un barrido dinámico de frecuencias a 5, 20 y 40 °C con una amplitud de oscilación del 0,2% en el intervalo de frecuencias entre 0,1-10 Hz. El módulo elástico (G' , Pa) y el módulo viscoso (G'' , Pa) se trazaron en función de la frecuencia y el exponente n fue calculado de la ecuación de la ley de energía ($G'_{(\omega)} = K' \cdot \omega^n$).

El barrido dinámico de temperatura fue realizado por calentamiento de las soluciones filmogénicas desde 5 a 90 °C a una velocidad de 1 °C/min, frecuencia de 1 Hz y tensión máxima 0,5%. El módulo elástico (G' ; Pa) y el módulo viscoso (G'' ; Pa) se trazaron en función de la temperatura en la rampa de calentamiento. Se realizaron dos determinaciones para cada muestra, con un error experimental menor al 6% en todos los casos.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con la aplicación de un análisis de comparaciones múltiples (test de Tukey) utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California, USA). El nivel de significación fue $p \leq 0,05$.

Resultados y discusión

Los ocho quitosanos presentaron un peso molecular (\overline{M}_η) similar a los obtenidos por Lalaleo (2010), si bien el grado de desacetilación (GD) fue mayor en todos los casos, superior al 77% (Tabla 2). Sin embargo, los quitosanos obtenidos sin la etapa de quitina no alcanzaron una desacetilación superior al 90%, tal como describió Alvarado *et al.*, (2007), probablemente debido a la especie utilizada. Asimismo, la adición del agente reductor (NaBH_4) protegió la cadena polimérica dando como resultado quitosanos con mayor peso molecular, al igual que observó Lalaleo (2010). Los métodos de obtención de quitosano tuvieron un efecto

Capítulo 1. Efecto del acondicionamiento en las propiedades antimicrobianas y reológicas de películas de quitosano

considerable sobre el GD y de manera especial sobre el \overline{M}_η , que disminuye (~3 veces) conforme aumenta el tiempo de desacetilación.

Tabla 2. Peso molecular (\overline{M}_η) y grado de desacetilación (GD) de quitosanos (Ch) obtenidos con (Q) o sin la etapa de obtención de quitina, con un tiempo de desacetilación (2 o 4) y con (R) o sin agente reductor.

Quitosano	\overline{M}_η (kDa)	GD (%)	Solubilidad
ChQ2	3000	77	<input checked="" type="checkbox"/>
ChQ4	1600	82	<input checked="" type="checkbox"/>
ChQR2	5600	84	<input checked="" type="checkbox"/>
ChQR4	1700	86	<input checked="" type="checkbox"/>
Ch2	2100	80	<input checked="" type="checkbox"/>
Ch4	690	84	<input checked="" type="checkbox"/>
ChR2	2200	81	<input checked="" type="checkbox"/>
ChR4	830	83	<input checked="" type="checkbox"/>

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los ocho tipos de quitosano, que difieren en peso molecular y grado de desacetilación (Tabla 2), se comparó inicialmente en forma de soluciones filmogénicas a una concentración de quitosano del 1% (p/p) (Tabla 3). Los quitosanos evaluados fueron eficaces contra microorganismos Gram-positivos (G+) y Gram-negativos (G-), siendo *B. coagulans* uno de los más sensibles ($p \leq 0,05$). La sensibilidad de las bacterias al quitosano continúa siendo motivo de controversia. Algunos investigadores argumentan que las bacterias Gram-positivas (Jeon, Park, y Kim, 2001) o Gram-negativas (Devlieghere, Vermeulen, y Debevere, 2004) son los microorganismos más sensibles al quitosano que los otros. Probablemente el tipo de cepa microbiana también puede influir en la actividad. Así, en el presente trabajo la inhibición de *P. phosphoreum* (G-) fue similar a la obtenida por *E. faecium* (G+). Además, la mayor inhibición se observó en *D. hansenii*, mientras que las soluciones filmogénicas resultaron inactivas frente a los mohos *A. niger* y *P. expansum* ($p \leq 0,05$) (Tabla 3). Roller *et al.*, (2002) describen que las levaduras son más sensibles que las bacterias a la acción del quitosano, mientras que otros autores establecen que el quitosano parece ser ineficaz contra los hongos que contienen quitosano como un componente de la pared celular (Allan y Hadwiger, 1979). Los resultados de este experimento demostraron que todas las soluciones

presentaron actividad antimicrobiana, si bien los quitosanos ChQ4, ChR2 y ChR4 mostraron una mayor capacidad de inhibición ($p \leq 0,05$), (Tabla 3).

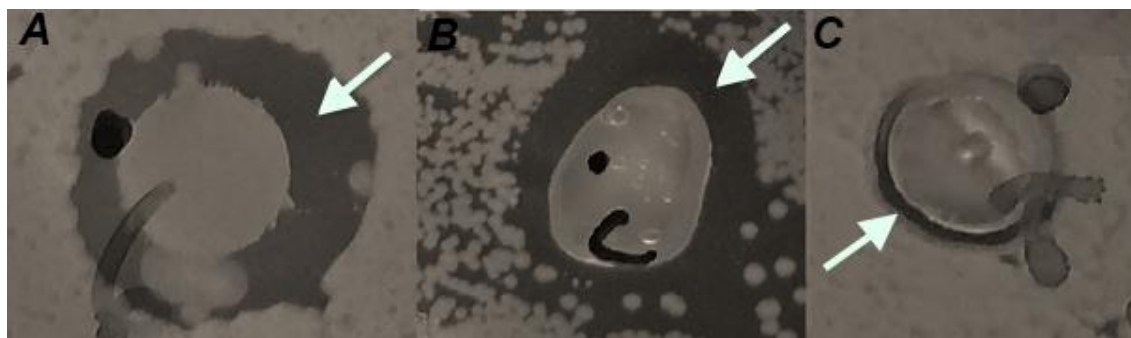


Figura 1. Actividad antimicrobiana del quitosano frente a *Aeromonas hydrophila* como **A)** solución filmogénica, **B)** película con 12 h de secado y mantenida a 90% de humedad relativa y **C)** película seca durante 24 h. Las flechas indican las áreas de inhibición.

La actividad antimicrobiana del quitosano se relaciona con el estado físico, tipo de microorganismo, factores intrínsecos (como el peso molecular y el grado de desacetilación) y factores ambientales (Kong, Chen, Xing, y Park, 2010). La actividad antimicrobiana del quitosano con bajo Mn se ha descrito como superior a la de quitosanos con alto Mn (Kim *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006). Además, esta actividad en quitosanos altamente desacetilados es mayor que la de aquellos presenta una mayor proporción de grupos amino acetilados (Aider, 2010). Este autor describe que un grado de desacetilación alto aumenta la solubilidad del quitosano y la densidad de carga, que son factores importantes para la adherencia del quitosano a la célula bacteriana. En el presente estudio, los quitosanos de diferente peso molecular, como son el Ch2 y Ch4 o ChR2 y ChR4, mostraron actividades similares (Tabla 3). Además, los resultados mostraron que el grado de desacetilación del quitosano, que aumenta con el tiempo de proceso (e. j. de 81% a 83% para ChR2 y ChR4, respectivamente), no parece influir en la actividad antimicrobiana, que fue muy similar en ambos quitosanos (Tabla 3). Park, Je, Byun, Moon, y Kim, (2004) obtuvieron quitosano con un 75% de GD con mayor actividad antimicrobiana que quitosanos con GD del 90% y 50%. La actividad antimicrobiana de los quitosanos en solución ChR2 y ChR4 fue superior que en Ch2 y Ch4 ($p \leq 0,05$) (Tabla 3). Este hecho se puede atribuir a la presencia de un agente reductor durante la obtención de quitosano, que podría influir de alguna manera en las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas a través de la protección de la depolimerización (Kendra y Hadwiger, 1984).

Asimismo, Devlieghere, Vermeulen, y Debevere, (2004) observaron que una polimerización baja (43 kDa) y grados de desacetilación altos (94%) son una combinación muy favorable para la actividad antimicrobiana.

Con el objetivo de evaluar la influencia de los métodos de acondicionamiento y la absorción de agua por parte de las películas en la capacidad de inhibición de microorganismos, las soluciones de quitosano con mayor actividad: ChQ4, ChR2 y ChR4, se secaron durante 12 h y 24 h. Estas películas, a su vez, se acondicionaron a tres niveles de humedad relativa (58, 75 y 90% HR), con el fin de obtener películas con diferente contenido de agua. En general e independientemente del tipo de quitosano, la actividad antimicrobiana fue mayor en las películas humectadas que en las películas con un tiempo de secado de 24h ($p \leq 0,05$) posiblemente debido a que el incremento del contenido de agua aumentó la cantidad total de los sitios activos y mejoró el efecto bactericida del quitosano (Tablas 4 y 5). Los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano se limitó a la zona circunscrita de la película en contacto directo con el agar (Fig. 1). Este hecho se debe al efecto antimicrobiano del quitosano, que tiene lugar sin la migración de compuestos activos (Brody, Strupinsky, y Kline, 2010; Leceta, Guerrero, y de la Caba, 2013). Por lo tanto, el quitosano, al estar en una matriz sólida, aparece como atrapado y su capacidad antimicrobiana se reduce (Zivanovic, Chi, y Draughon, 2005). Con respecto a la humedad relativa, los mayores halos de inhibición se obtuvieron en las muestras acondicionadas a un 90% HR y fueron más pronunciados en las películas con 12 h de secado ($p \leq 0,05$) (Tabla 4), lo que coincide con un mayor contenido de humedad. De hecho, en el presente trabajo, las películas secadas durante 12 h expuestas a 90% RH fueron muy similares en su viscosidad a las soluciones de quitosano con un 3% (p/p) de concentración.

Las películas de quitosano fueron eficaces frente a algunos microorganismos relacionados con el deterioro (por ejemplo, *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*) y patógenos del pescado (por ejemplo, *L. monocytogene* y *V. parahaemolyticus*) (Tablas 4 y 5). Estas películas, con diversos contenidos de humedad, aplicadas durante la conservación de pescado en estado refrigerado podrían contribuir a la estabilidad y aumento de la vida útil, tal como se describe con los recubrimientos de quitosano aplicados en salchichas de pescado y hamburguesas de pescado, respectivamente (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos, y Montero, 2005a; López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos, y Montero, 2005b).

Tabla 3. Actividad antimicrobiana cuantitativa (mm) de las diferentes soluciones filmogénicas frente a los microorganismos seleccionados.

Microorganismos	QUITOSANOS							
	ChQ2	ChQ4	ChQR2	ChQR4	Ch2	Ch4	ChR2	ChR4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6 ± 0,01a	12 ± 0,03a,b,c	5 ± 0,01a	4 ± 0,06a	10 ± 0,01b,d	14 ± 0,01c	9 ± 0,03d	9,5 ± 0,74b,d
<i>Aspergillus niger</i>	5 ± 0,06a	4 ± 0,03a	5 ± 0,07a	5 ± 0,03a	5 ± 0,01a	5 ± 0,01a	5 ± 0,03a	6,5 ± 2,14a
<i>Bacillus cereus</i>	7 ± 0,08a,b	5 ± 0,03a	5 ± 0,08a	6 ± 0,03a	9 ± 0,03b	5 ± 0,01a	7 ± 0,04a,b	6 ± 1,4a
<i>Bacillus coagulans</i>	10 ± 0,06a,d	18 ± 0,03b	5 ± 0,03c	9 ± 0,06a	11 ± 0,04a,d,e	12 ± 0,03d,e	9 ± 0,04a	13,5 ± 0,39e
<i>Bifidobacterium animalis</i>	11 ± 0,14a,c	10 ± 0,04a	5 ± 0,04b	10 ± 0,06a	17 ± 0,03d	10 ± 0,04a	14 ± 0,06e	13,5 ± 0,66c,e
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	8 ± 0,07a,c	7 ± 0,07a	8 ± 0,01a,c	12 ± 0,07b,d	9 ± 0,03a,c,d	12 ± 0,04b,d	10 ± 0,06b,c,d	11 ± 1,46d
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	5 ± 0,03a	5 ± 0,01a,c	4 ± 0,14a	6 ± 0,07a,b,c	7 ± 0,04b	5 ± 0,07a,b	7 ± 0,07b,c	6 ± 1,36a,b
<i>Citrobacter freundii</i>	5 ± 0,10a	8 ± 0,01b	5 ± 0,14a	5 ± 0,06a	11 ± 0,07c	8 ± 0,07b	11 ± 0,08c	11,5 ± 0,72c
<i>Clostridium perfringens</i>	7 ± 0,04a,b	5 ± 0,08a	5 ± 0,06a	7 ± 0,01a,b	8 ± 0,07b	5 ± 0,07a	5 ± 0,04a	5 ± 0,14a
<i>Debaryomyces hansenii</i>	12 ± 0,03a	27 ± 0,11b	6 ± 0,11c,d	8 ± 0,01c,d,e	11 ± 0,06a,d	10 ± 0,08d,e	9 ± 0,03d	12,5 ± 0,09a
<i>Enterococcus faecium</i>	14 ± 0,08a	17 ± 0,10b	10 ± 0,08c	7 ± 0,01d	12 ± 0,06a,c	12 ± 0,11a,c,d	12 ± 0,01a,c	11 ± 1,3c
<i>Escherichia coli</i>	5 ± 0,06a	7 ± 0,13a,b	5 ± 0,06a	6 ± 0,14a,b	7 ± 0,03a,b	5 ± 0,04a	8 ± 0,03b	6,5 ± 1,99 a,b
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	8 ± 0,08a,b,c	10 ± 0,08a	6 ± 0,10b	7 ± 0,11b	16 ± 0,04c	13 ± 0,04c	14 ± 0,14c	13,5 ± 0,59c
<i>Lactobacillus helveticus</i>	6 ± 0,14a,b,c,d	8 ± 0,08a,c,d	4 ± 0,11b	5 ± 0,13b,c	8 ± 0,01a,d	7 ± 0,03c	10 ± 0,04d	8,5 ± 2,02ca,c,d
<i>Listeria monocytogenes</i>	6 ± 0,01a,b	6 ± 0,07a,b	6 ± 0,11a,b	8 ± 0,08a,b	7 ± 0,14a	5 ± 0,11b	7 ± 0,04a,b	6,5 ± 0,61a,b
<i>Listeria innocua</i>	8 ± 0,11a,c	10 ± 0,06a	3 ± 0,10b	5 ± 0,06b,c	7 ± 0,03c	6 ± 0,07c	7 ± 0,11c	6,5 ± 0,62c
<i>Penicillium expansum</i>	5 ± 0,13a	4 ± 0,06a	5 ± 0,06a	5 ± 0,04a	4 ± 0,03a	5 ± 0,06a	5 ± 0,11a	5 ± 0,07a
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	8 ± 0,11a	13 ± 0,04b	8 ± 0,07a	13 ± 0,08b	14 ± 0,06b	13 ± 0,06b	7 ± 0,11a	8 ± 1,5a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 ± 0,07a,c	5 ± 0,04a,c	5 ± 0,06a,c	7 ± 0,14a,b	8 ± 0,06b	5 ± 0,06c	7 ± 0,06a,b,c	6 ± 1,37a,c
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4 ± 0,03a	11 ± 0,11b,c	6 ± 0,08a	5 ± 0,14a	13 ± 0,04b	10 ± 0,14b,c	9 ± 0,10c	9,5 ± 0,74b,c
<i>Salmonella choleraesuis</i>	6 ± 0,04a,b	7 ± 0,14a,b	5 ± 0,01a	5 ± 0,11a	6 ± 0,08a,b	6 ± 0,08a,b	8 ± 0,06b	6,5 ± 2,11a,b
<i>Shewanella putrefaciens</i>	11 ± 0,07a,e	8 ± 0,14b,c	8 ± 0,03b,c	6 ± 0,03c	9 ± 0,08a,b	15 ± 0,01d	12 ± 0,10e	14,5 ± 3,61d,e
<i>Shigella sonnei</i>	5 ± 0,06a,c	5 ± 0,07a,c	5 ± 0,04a,c	7 ± 0,03a,c	10 ± 0,08b	6 ± 0,03c	11 ± 0,07d	11,5 ± 0,76b,d
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 ± 0,03a	4 ± 0,06a	5 ± 0,03a,b,c	28 ± 0,04b	6 ± 0,10a,c	5 ± 0,03a,c	7 ± 0,10c	6,5 ± 0,65a,b,c
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8 ± 0,08a	7 ± 0,08a	12 ± 0,11b,c	14 ± 0,01b	9 ± 0,11a	7 ± 0,04a	12 ± 0,10b,c	9,5 ± 3,45a,c
<i>Yersinia enterocolitica</i>	7 ± 0,08a,b,c,d	5 ± 0,11a	6 ± 0,10a,b,d	8 ± 0,01b,c	10 ± 0,04c,b,d	6 ± 0,08b	11 ± 0,14d	8,5 ± 3,51b,d

Letras diferentes (a, b, c, d, e) representan diferencias significativas entre los diferentes quitosanos para el mismo microorganismo.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana (mm) de las películas de quitosano secadas durante 12 h y acondicionadas a diferente humedad relativa

Microorganismos	ChQ4			ChR2			ChR4		
	58	75	90	58	75	90	58	75	90
Actividad de agua	0,76±0,12	0,73±0,07	0,72±0,06	0,78±0,08	0,79±0,1	0,79±0,09	0,85±0,06	0,88±0,09	0,87±0,08
Contenido de agua (%)	49±0,08	37±0,12	58±0,06	58±0,04	61±0,08	57±0,12	71±0,14	70±0,15	73±0,14
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6,7 ± 0,08 a	7,7 ± 0,03b,e	10,2 ± 0,06 c	9,4 ± 0,05 d	7,7 ± 0,02 d	10,2 ± 0,04 d	7,7 ± 0,03 d	7,7 ± 0,14 f	8,6 ± 0,15 e
<i>Aspergillus niger</i>	10,2 ± 0,06 a	8,6 ± 0,02b,e	9,4 ± 0,03 a	10,2 ± 0,06 c	7,7 ± 0,03 d	9,4 ± 0,03 c	6,7 ± 0,06 f	8,6 ± 0,08 a	10,2 ± 0,09 e
<i>Bacillus cereus</i>	6,7 ± 0,04 a	6,7 ± 0,01 c	5,5 ± 0,00 b	5,5 ± 0,07 c	7,7 ± 0,03c,d	7,7 ± 0,10 a	6,7 ± 0,03 a	7,7 ± 0,03 c	13,4 ± 0,04 e
<i>Bacillus coagulans</i>	6,7 ± 0,05 a	6,7 ± 0,01 b	5,5 ± 0,04 a	6,7 ± 0,07 a	7,7 ± 0,03 c	8,6 ± 0,03 a	6,7 ± 0,04 a	6,7 ± 0,06a,b	6,7 ± 0,07 d
<i>Bifidobacterium animalis</i>	14,4 ± 0,09 a	6,7 ± 0,03 b	14,9 ± 0,03 c	10,2 ± 0,06 f	8,6 ± 0,03 e	10,2 ± 0,02 d	7,7 ± 0,02 d	9,4 ± 0,16gh	13,4 ± 0,18 g
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	14,4 ± 0,09 a	10,2 ± 0,04b,c	12,8 ± 0,02 c	8,6 ± 0,08 f	9,4 ± 0,03 e	10,9 ± 0,02 d	7,7 ± 0,01 d	12,2 ± 0,17 h	10,9 ± 0,19 g
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	7,7 ± 0,12 a	7,7 ± 0,05 c	10,2 ± 0,03 b	0,0 ± 0,00b,c	7,7 ± 0,03a,d	9,4 ± 0,02 a	7,7 ± 0,06 e	8,6 ± 0,23 c	8,6 ± 0,26 d
<i>Citrobacter freundii</i>	6,7 ± 0,09 a	6,7 ± 0,03c,d	6,7 ± 0,06 b	6,7 ± 0,15b,c,d	6,7 ± 0,06 a	7,7 ± 0,05 a	7,7 ± 0,03 d	8,6 ± 0,16 a	8,6 ± 0,18 a
<i>Clostridium perfringens</i>	13,4 ± 0,10 a	8,6 ± 0,04 b	9,4 ± 0,05 c	10,2 ± 0,03e,f	8,6 ± 0,10d,f	10,2 ± 0,04 d	7,7 ± 0,04 d	9,4 ± 0,18 g	12,8 ± 0,20f,g
<i>Debaryomyces hansenii</i>	8,6 ± 0,04 a	6,7 ± 0,01b,d	7,7 ± 0,05 c	10,2 ± 0,10d,e	8,6 ± 0,04 a	7,7 ± 0,04 c	6,7 ± 0,02 g	7,7 ± 0,04 f	6,7 ± 0,04b,e
<i>Enterococcus faecium</i>	6,7 ± 0,05 a	8,6 ± 0,02 b	7,7 ± 0,03c,h	7,7 ± 0,07 e	9,4 ± 0,03 d	7,7 ± 0,02 c	6,7 ± 0,01a,h	8,6 ± 0,07f,g	10,9 ± 0,08b,d,f
<i>Escherichia coli</i>	6,7 ± 0,00 a	7,7 ± 0,03 b	7,7 ± 0,01 c	8,6 ± 0,10d,e	7,7 ± 0,04 d	9,4 ± 0,01 d	7,7 ± 0,02d,e	7,7 ± 0,06 f	8,6 ± 0,06 e
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	12,2 ± 0,05 a	7,7 ± 0,01 b	16,4 ± 0,00 c	9,4 ± 0,07d,h	8,6 ± 0,03 e	9,4 ± 0,00d,h	7,7 ± 0,01 h	7,7 ± 0,06 g	6,7 ± 0,06f,g
<i>Lactobacillus helveticus</i>	6,7 ± 0,03a,d,e	7,7 ± 0,00 a	6,7 ± 0,03 b	6,7 ± 0,07 c	7,7 ± 0,03 c	6,7 ± 0,02c,e	6,7 ± 0,03 e	7,7 ± 0,01a,d	10,2 ± 0,01 d
<i>Listeria monocytogenes</i>	6,7 ± 0,08 a	6,7 ± 0,03 b	8,6 ± 0,03 c	8,6 ± 0,06 c	7,7 ± 0,03 e	9,4 ± 0,02a,d	6,7 ± 0,00 a	7,7 ± 0,14 f	7,7 ± 0,16d,e
<i>Listeria innocua</i>	6,7 ± 0,07a,d	6,7 ± 0,03 c	6,7 ± 0,03 b	7,7 ± 0,08 d	6,7 ± 0,03 a	12,8 ± 0,02a,d	6,7 ± 0,01 d	6,7 ± 0,13 c	5,5 ± 0,14 a
<i>Penicillium expansum</i>	10,9 ± 0,13 a	6,7 ± 0,06 b	9,4 ± 0,03c,e	7,7 ± 0,08 d	6,7 ± 0,03 d	11,6 ± 0,03d,g	6,7 ± 0,01 d	6,7 ± 0,26 f	9,4 ± 0,29 e
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	10,9 ± 0,04 a	6,7 ± 0,01 b	8,6 ± 0,04c,f	7,7 ± 0,08 cd	8,6 ± 0,04 e	9,4 ± 0,03 d	6,7 ± 0,06 f	8,6 ± 0,04 d	8,6 ± 0,04d,e,f
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,7 ± 0,10 a	7,7 ± 0,04 b	7,7 ± 0,05 c	7,7 ± 0,07 d	7,7 ± 0,03d,e	10,2 ± 0,04 d	6,7 ± 0,04 a	7,7 ± 0,19 f	11,6 ± 0,21 e
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8,6 ± 0,06 a	6,7 ± 0,02 c	9,4 ± 0,03 b	7,7 ± 0,07 a	7,7 ± 0,03 d	6,7 ± 0,03 c	5,5 ± 0,04 c	8,6 ± 0,09 c	16,8 ± 0,10 e
<i>Salmonella choleraesuis</i>	6,7 ± 0,06 a	7,7 ± 0,02 a	9,4 ± 0,04 b	8,6 ± 0,06b,c	8,6 ± 0,03 d	6,7 ± 0,03 c	6,7 ± 0,05 a	7,7 ± 0,10 f	7,7 ± 0,11 e
<i>Shewanella putrefaciens</i>	7,7 ± 0,07 a	7,7 ± 0,03 b	11,6 ± 0,05 c	8,6 ± 0,08 d	8,6 ± 0,03 e	9,4 ± 0,04a,c	7,7 ± 0,04 a	8,6 ± 0,12 f	10,2 ± 0,13 d
<i>Shigella sonnei</i>	5,5 ± 0,02 a	6,7 ± 0,02 b	8,6 ± 0,06 c	8,6 ± 0,12 g	7,7 ± 0,01b,e	7,7 ± 0,05 d	6,7 ± 0,02 d	8,6 ± 0,06 h	10,2 ± 0,03 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,7 ± 0,12 a	7,7 ± 0,05 a	8,6 ± 0,05 b	7,7 ± 0,10 c	7,7 ± 0,04 c	6,7 ± 0,04 c	6,7 ± 0,01 a	7,7 ± 0,23 e	10,2 ± 0,26 d
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7,7 ± 0,10 a	7,7 ± 0,04 b	10,2 ± 0,05 c	9,4 ± 0,07 e	7,7 ± 0,03 a	10,2 ± 0,04a,d	6,7 ± 0,02 f	7,7 ± 0,19 d	18,5 ± 0,21b,d,e
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6,7 ± 0,10 a	7,7 ± 0,04 c	6,7 ± 0,02 b	5,5 ± 0,10 d	7,7 ± 0,04 c	7,7 ± 0,02 c	6,7 ± 0,01 a	6,7 ± 0,19 c	11,6 ± 0,21 a,d

Letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g) representan diferencias significativas entre los diversos quitosanos para el mismo microorganismo.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana (mm) de las películas de quitosano secadas durante 24 horas y acondicionadas a diferente humedad relativa.

Microorganismo	HR (%)	ChQ4			Chr2			Chr4		
		58	75	90	58	75	90	58	75	90
Activad de agua	0,53±0,08	0,56±0,014	0,68±0,1	0,52±0,12	0,58±0,12	0,64±0,06	0,53±0,06	0,64±0,12	0,94±0,01	
Contenido de agua (%)	19±0,06	37±0,16	41±0,18	27±0,06	33±0,10	43±0,12	28±0,08	56±0,08	45±0,08	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7,7 ± 0,03b	7,7 ± 0,01b,d	6,7 ± 0,02a	7,7 ± 0,01b	7,7 ± 0,02b	7,7 ± 0,02b,d	7,7 ± 0,07d	8,6 ± 0,02c	6,7 ± 0,02a	
<i>Aspergillus niger</i>	6,7 ± 0,05b	7,7 ± 0,01a,c,d	6,7 ± 0,01 a	7,7 ± 0,03e	9,4 ± 0,08d,e,f	8,6 ± 0,01c	9,4 ± 0,13e	10,2 ± 0,01f	9,4 ± 0,01b	
<i>Bacillus cereus</i>	6,7 ± 0,01b	6,7 ± 0,00a,b	6,7 ± 0,02 a	6,7 ± 0,00a,b	6,7 ± 0,00a,b	7,7 ± 0,01c	6,7 ± 0,06d	7,7 ± 0,00c	7,7 ± 0,00c	
<i>Bacillus coagulans</i>	6,7 ± 0,01c	7,7 ± 0,01b	10,2 ± 0,02 a	7,7 ± 0,00b	7,7 ± 0,00b	6,7 ± 0,01c,d	6,7 ± 0,08d	7,7 ± 0,01b	10,9 ± 0,01c	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	7,7 ± 0,10c,d,e,f	8,6 ± 0,01b	12,2 ± 0,02 a	9,4 ± 0,09d,e	6,7 ± 0,01d	16,4 ± 0,02c	7,7 ± 0,04b	10,2 ± 0,02f	14,4 ± 0,01c	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	7,7 ± 0,02c,d,e,f	8,6 ± 0,01b	14,9 ± 0,01 a	10,2 ± 0,00c,e	7,7 ± 0,01d	10,2 ± 0,02c,d	8,6 ± 0,01c	10,2 ± 0,02f	12,8 ± 0,01c	
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	7,7 ± 0,03c,d	9,4 ± 0,02b	6,7 ± 0,01 a	9,4 ± 0,01b	7,7 ± 0,01d	8,6 ± 0,03c	8,6 ± 0,13d,e	8,6 ± 0,03c	7,7 ± 0,02c,d	
<i>Citrobacter freundii</i>	6,7 ± 0,02b	8,6 ± 0,01a,d	6,7 ± 0,02a,b,c	6,7 ± 0,01b	6,7 ± 0,03b	6,7 ± 0,02b	7,7 ± 0,06d	7,7 ± 0,02e	8,6 ± 0,01d	
<i>Clostridium perfringens</i>	7,7 ± 0,10c,d,e	8,6 ± 0,02b	8,6 ± 0,01 a	9,4 ± 0,09d,e	7,7 ± 0,02d	6,7 ± 0,02c	10,2 ± 0,08d	10,9 ± 0,03e	8,6 ± 0,02a,b	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5,5 ± 0,00c	6,7 ± 0,00b,d	14,9 ± 0,01 a	6,7 ± 0,01d	6,7 ± 0,02b	18,9 ± 0,01c,d	7,7 ± 0,07d	7,7 ± 0,01e	13,9 ± 0,00c	
<i>Enterococcus faecium</i>	6,7 ± 0,02a,c	7,7 ± 0,01b,d,e	7,7 ± 0,02a,d,e	7,7 ± 0,00d	6,7 ± 0,01c,d	7,7 ± 0,01a,b	6,7 ± 0,01d	8,6 ± 0,01c	10,2 ± 0,01e	
<i>Escherichia coli</i>	6,7 ± 0,02b	5,5 ± 0,04a	6,7 ± 0,02a,b,c,d	8,6 ± 0,01c	6,7 ± 0,01b	6,7 ± 0,00b,d	6,7 ± 0,04d,e	7,7 ± 0,02d	9,4 ± 0,01d	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6,7 ± 0,00b	6,7 ± 0,08b	7,7 ± 0,01 a	8,6 ± 0,01e	6,7 ± 0,01b,d	8,6 ± 0,01c,d	9,4 ± 0,06e	10,2 ± 0,01c	9,4 ± 0,00c	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	6,7 ± 0,05b,d	6,7 ± 0,03b	7,7 ± 0,02a,d	5,5 ± 0,04c	7,7 ± 0,01a,c,d	6,7 ± 0,01b	8,6 ± 0,05c	7,7 ± 0,00d	6,7 ± 0,07c	
<i>Listeria monocytogenes</i>	6,7 ± 0,02b,e	8,6 ± 0,01a,c	6,7 ± 0,02a,e	6,7 ± 0,00e	7,7 ± 0,0d1	8,6 ± 0,02c	8,6 ± 0,01c	7,7 ± 0,02d	8,6 ± 0,01b	
<i>Listeria innocua</i>	6,7 ± 0,00c	7,7 ± 0,01b,d	5,5 ± 0,02 a	7,7 ± 0,01d	7,7 ± 0,01b,d	6,7 ± 0,02c	6,7 ± 0,03c	6,7 ± 0,02e	5,5 ± 0,01c	
<i>Penicillium expansum</i>	6,7 ± 0,04c	9,4 ± 0,02b	7,7 ± 0,06 a	8,6 ± 0,02d	6,7 ± 0,01c	9,4 ± 0,03b	7,7 ± 0,01a	5,5 ± 0,04e	7,7 ± 0,02a	
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	10,2 ± 0,03b	6,7 ± 0,00a,d	10,2 ± 0,02 a	5,5 ± 0,01c	6,7 ± 0,01d	10,9 ± 0,01c	8,6 ± 0,13d	7,7 ± 0,01c	14,4 ± 0,00b	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,7 ± 0,01c,d	8,6 ± 0,02b	7,7 ± 0,02 a	6,7 ± 0,00d	7,7 ± 0,04a	6,7 ± 0,02c,d	7,7 ± 0,09a	7,7 ± 0,03a	7,7 ± 0,02a	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6,7 ± 0,02c	7,7 ± 0,01b	5,5 ± 0,01 a	8,6 ± 0,00d	5,5 ± 0,02a	7,7 ± 0,01b	7,7 ± 0,09b	8,6 ± 0,01d	7,7 ± 0,01b	
<i>Salmonella choleraeisu</i>	6,7 ± 0,02b	7,7 ± 0,01a,c	6,7 ± 0,01a,b,d	9,4 ± 0,00d	7,7 ± 0,03c	6,7 ± 0,01b,d	6,7 ± 0,01d	9,4 ± 0,01b	6,7 ± 0,01b	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	6,7 ± 0,05c,e	7,7 ± 0,01b	7,7 ± 0,01 a	6,7 ± 0,01c	6,7 ± 0,02c	8,6 ± 0,02d	9,4 ± 0,07d,e	9,4 ± 0,02e	8,6 ± 0,01e	
<i>Shigella sonnei</i>	6,7 ± 0,05b,d	6,7 ± 0,01b,d	7,7 ± 0,01 a	6,7 ± 0,04d	6,7 ± 0,03b,d	8,6 ± 0,01c	7,7 ± 0,04a	7,7 ± 0,01a	8,6 ± 0,01c	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,7 ± 0,06b,c	9,4 ± 0,02a	7,7 ± 0,02a,c,d,e	7,7 ± 0,04c	6,7 ± 0,02d,e	6,7 ± 0,03c,d	7,7 ± 0,01e	6,7 ± 0,03d	7,7 ± 0,02c	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9,4 ± 0,01a,e	8,6 ± 0,02b	6,7 ± 0,02a,c,e	3,9 ± 0,01d	6,7 ± 0,02c,e	6,7 ± 0,02c	8,6 ± 0,04b	7,7 ± 0,03d	6,7 ± 0,02e	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	8,6 ± 0,07b	8,6 ± 0,02b	7,7 ± 0,02 a	6,7 ± 0,06c	6,7 ± 0,01d	5,5 ± 0,02c	6,7 ± 0,01d	7,7 ± 0,03a	6,7 ± 0,02a	

Letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g) representan diferencias significativas entre los diversos quitosanos para el mismo microorganismo.

Capítulo 1. Efecto del acondicionamiento en las propiedades antimicrobianas y reológicas de películas de quitosano

En el presente trabajo, el pH de todas las soluciones y de las películas resultantes de los quitosanos seleccionados (ChQ4, ChR2 y ChR4) se ajustó a 5,2 para evitar el efecto limitante del pH ácido en el crecimiento microbiano. Con el fin de determinar también el efecto del quitosano sin la corrección del pH, en estos tres quitosanos (pH 3,2) se evaluó la actividad antimicrobiana de las soluciones filmogénicas y películas secas (durante 24 h acondicionadas al 58% HR) frente a microorganismos más resistentes a pH ácido (Tabla 6). Los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana del quitosano se incrementó a un pH más bajo, si bien la actividad permanece a pH 5 (Tabla 4 y 5). Considerando que en el quitosano la carga positiva del grupo amino en el C2 se mantiene por debajo de su pKa (pH 6,3) (Helander, Nurmiäho-Lassila, Ahvenainen, Rhoades, y Roller, 2001; Kong, Chen, Xing, y Park, 2010), a pH más bajo la proporción de grupos amino es mayor debido al aumento de la solubilidad (Vásconez, Flores, Campos, Alvarado, y Gerschenson, 2009). Por otra parte, la actividad antimicrobiana del quitosano fue mayor en solución filmogénica que en película, probablemente por la menor disponibilidad de grupos activos del quitosano en las películas.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana cuantitativa (mm) de las soluciones filmogénicas (FS1) y películas (P58) de quitosano al 1% p/p en ácido láctico 0,15M a pH 3,2.

Microorganismo	ChQ4		ChR2		ChR4	
	SF1	P58	SF1	P58	SF1	P58
<i>L. acidophilus</i>	17,8±0,05 b,y	6,9±0,01 a,x	13,9±0,08 b,x	7,8±0,09 a,y	14,7±0,05 b,z	7,8±0,04 a,y
<i>L. helveticus</i>	16,2±0,08 b,z	6,7±0,02 a,x	11,1±0,04 b,y	7,9±0,035 a,y	10,7±0,09 b,x	9,7±0,09 a,y
<i>D. hansenii</i>	12,0±0,06 b,y	11,6±0,04 a,z	11,0±0,03 b,x	7,7±0,04 a,x	12,9±0,1 b,z	9,1±0,06 a,y
<i>P. expansum</i>	10,5±0,03 b,y	6,2±0,07 a,x	9,7±0,1 b,x	8,2±0,01 a,y	16,3±0,05 b,z	7,8±0,07 a,z

Los resultados son la media ± desviación estándar. Letras diferentes (a,b) en la misma columna indican diferencias significativas entre el estado del quitosano SF1 y P58. Letras diferentes (x,y,z) indican diferencias significativas entre los distintos quitosanos en el mismo SF1 o P58.

Propiedades viscoelásticas de las soluciones de quitosano

Las soluciones de quitosano al 1% (p/v) tuvieron un comportamiento típico de una solución diluida, con $G'' > G'$ (resultados no mostrados). Esta concentración fue eficaz frente a los microorganismos seleccionados y adecuada para su utilización como cobertura, permitiendo la inmersión del alimento para producir una capa protectora. Sin embargo, para una mejor comparación del comportamiento reológico de los diferentes quitosanos, la concentración de polímero se incrementó hasta un 3%. La finalidad fue aumentar la densidad e interacción de la cadena polimérica, lo que permite el estudio de las transiciones sol-gel en función de la

temperatura y otros eventos térmicos relacionados con el peso molecular o el grado de desacetilación.

En la Figura 2 se representan los perfiles de temperatura de las soluciones de quitosano a pH 5,7. A temperaturas bajas y moderadas ($<45\text{ }^{\circ}\text{C}$), todas las muestras mostraron el comportamiento viscoelástico típico de un líquido, donde G' es menor que G'' (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput, y Kandani, 2001; Tang, Du, Hu, Shi, y Kennedy, 2007). El comportamiento tipo viscoso se mantuvo a lo largo del intervalo de temperatura en los quitosanos con bajo peso molecular (ChQR4, Ch4 y ChR4), donde no se evidenció ningún punto de intersección ($G' = G''$). Estas muestras presentaron los valores más bajos de G' y G'' a bajas temperaturas ($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$) y además exhibieron una dependencia negativa, atribuido a una mayor flexibilidad y a una disminución en el entrelazamiento de la cadena con el aumento de la temperatura, debido probablemente a la rotura de enlaces de hidrógeno en la red polimérica.

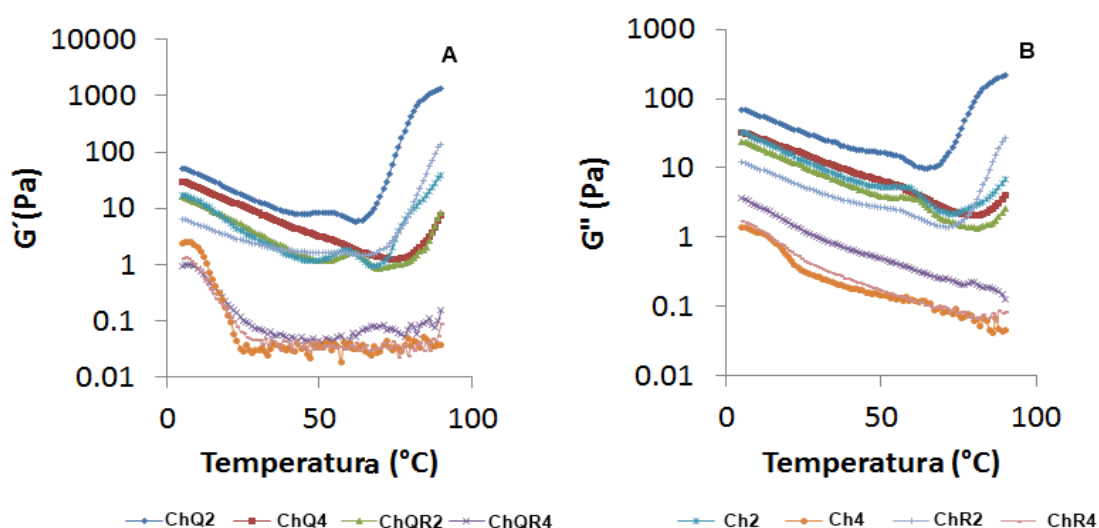


Figura 2. Dependencia del A) módulo elástico (G' , Pa) y B) módulo viscoso (G'' , Pa) con la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para soluciones filmogénicas de quitosano a $\text{pH } 5,7 \pm 0,2$ durante el calentamiento de 5 a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Por el contrario, los quitosanos ChQ2, ChQ4, ChQR2, Ch2 y ChR2 sufrieron un drástico aumento en los valores de G' a partir de temperaturas que varían dependiendo del tipo de quitosano ($67\text{ }^{\circ}\text{C}$, $82\text{ }^{\circ}\text{C}$, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $47\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente), produciendo un comportamiento elástico, donde $G' > G''$. Este hecho podría estar asociado a la formación parcial de fracciones agrupadas de quitosano a través de interacciones hidrofóbicas estables provocadas por el calor. A bajas temperaturas, las interacciones quitosano-agua protegen las

cadena de quitosano contra la agregación. Al calentar, se observó claramente la agregación del polímero debido a la eliminación de las moléculas de agua que permite la asociación de las macromoléculas de quitosano. Curiosamente, el quitosano ChR2 exhibió una capacidad relativamente alta de agregación térmica, probablemente mediante interacciones hidrofóbicas, a pesar de los valores relativamente bajos de G' y G'' registrados a bajas temperaturas. Este quitosano (ChR2), caracterizado por un peso molecular medio (2200 kDa), mostró una gran actividad antimicrobiana cuando se aplicó en forma de solución filmogénica. Por el contrario, con el quitosano ChQ4, que también mostró buenas propiedades antimicrobianas, se observó un comportamiento dependiente de la temperatura opuesto. El alto grado de desacetilación (82%) y relativo bajo peso molecular (1600 kDa) en ChQ4 podrían inducir la formación de enlaces de hidrógeno, lo que conduce a valores superiores de G' a bajas temperaturas; sin embargo, exhibió una capacidad de agregación térmica mucho menor que ChR2. Así, el grado de desacetilación y el peso molecular son factores importantes para determinar la contribución de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en los fenómenos de asociación del quitosano.

Los quitosanos ChQR2 y Ch2 presentaron un evento térmico en G' a ~ 60 °C probablemente asociado a una relajación, en la cual, la red de quitosano pierde la movilidad. Sin embargo, no se pudo establecer ninguna relación definida entre este evento termal y las propiedades moleculares del quitosano.

En los quitosanos ChQ4, ChR2 y ChR4, que mostraron mayor actividad antimicrobiana, se evaluó su comportamiento reológico. En la Figura 3 se presentan los espectros mecánicos a 5, 20 y 40 °C de las soluciones de quitosano en términos del módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') en función de la frecuencia angular. La dependencia con la frecuencia de G' y G'' varió considerablemente dependiendo del tipo de quitosano y la temperatura. El quitosano ChQ4, con el mayor grado de desacetilación, presentó perceptiblemente una mayor G' y G'' a lo largo del intervalo de frecuencia y fue el único donde $G' > G''$, independientemente de la temperatura.

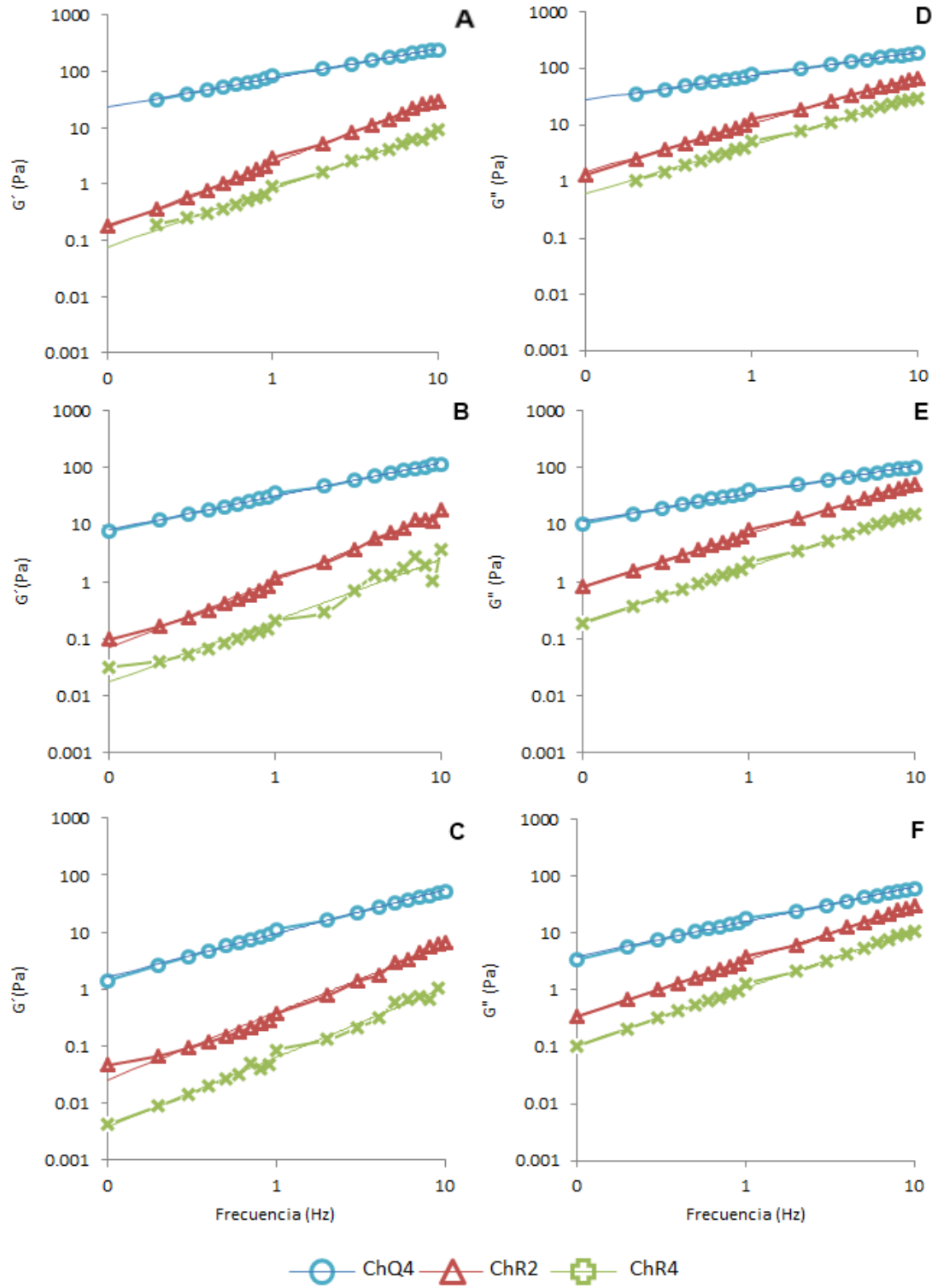


Figura 3. Dependencia del módulo elástico (G' , Pa) y el módulo viscoso (G'' , Pa) con la frecuencia angular en las soluciones de quitosano a pH 5,7. (A, D) 5 °C, (B, E) 20 °C y (C, F) 40 °C.

Capítulo 1. Efecto del acondicionamiento en las propiedades antimicrobianas y reológicas de películas de quitosano

La Tabla 7 muestra los parámetros viscoelásticos derivados de los espectros mecánicos calculados después de aplicar la ley de la potencia. Según Zhou y Mulvaney (1998), G_0' y G_0'' indicarían la resistencia del material a la deformación elástica y viscosa, respectivamente, con una frecuencia angular de 1 rad/s. Estos parámetros fueron muy superiores en ChQ4 (GD más alto), en comparación con los ChR2 y ChR4 y tendió a disminuir conforme aumentó la temperatura. Los quitosanos ChR2 y ChR4 tuvieron un comportamiento similar dependiente de la temperatura, lo que se atribuye a una disminución de los enlaces de hidrógeno. El exponente n' de la ley de potencia está relacionado con la conformación estructural y estabilidad en las muestras estudiadas: cuanto mayor sea el valor de n' , mayor será la inestabilidad de la matriz frente a los cambios de frecuencia. Los quitosanos ChR2 y ChR4, con un valor promedio de n' de $\sim 1,24$ y $\sim 1,11$, respectivamente, muestran el típico comportamiento de fluidos newtonianos (Tabla 7). Por el contrario, el ChQ4 presenta un valor de n' de $\sim 0,62$, similar a los resultados obtenidos por Scanlan y Winter, (1991) de 0,19-0,9. Estos autores sugieren que los valores de n' pueden variar dependiendo de la estequiometría, concentración del polímero y peso molecular. Otros autores consideran que no hay ningún valor universal para n' , que probablemente se relaciona con la naturaleza específica de cada sistema de gelificación (Richter, Boyko, y Schröter, 2004).

Tabla 7. Parámetros reológicos derivados del barrido de frecuencias para las diferentes soluciones de quitosano después de aplicar la ley de la potencia.

Temperatura (°C)	G_0'			G_0''			n'			n''		
	ChQ4	ChR2	ChR4	ChQ4	ChR2	ChR4	ChQ4	ChR2	ChR4	ChQ4	ChR2	ChR4
5	76,08	2,33	0,81	73,88	10,42	4,38	0,52	1,14	1,01	0,42	0,84	0,86
20	31,69	1,04	0,21	35,49	6,84	1,82	0,58	1,18	1,10	0,48	0,90	0,96
40	9,49	0,39	0,06	15,87	3,29	1,09	0,77	1,18	1,22	0,61	0,97	1,01

Los cambios en el comportamiento reológico de las soluciones de quitosano se asocian con el peso molecular y grado de desacetilación. El quitosano ChQ4, con un GD alto y \overline{M}_η medio, produce un gran número de interacciones intra e intermoleculares causadas por interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno, dando como resultando un sistema más complejo, independientemente de la temperatura. Por el contrario, el quitosano ChR2 no mostró este comportamiento a temperatura baja o moderada (< 40 °C), a pesar de que ambos quitosanos

tienen GD semejante. Por otro lado, la disminución de los valores de G' y G'' observada en el quitosano ChR4 puede estar relacionada con su bajo peso molecular.

Conclusiones

Las soluciones filmogénicas de quitosano, independientemente de su GD y \overline{M}_η poseen actividad antimicrobiana. Las películas de quitosano presentan actividad antimicrobiana que se limita al área en contacto directa con los microorganismos. Una forma de mejorar la actividad antimicrobiana de estas películas es la difusión de moléculas de quitosano mediante el empleo de películas parcialmente secas o películas mantenidas en una humedad relativa elevada con mayor disponibilidad de agua (similar a una cobertura pero más viscosa), que presentan mayor disponibilidad y accesibilidad de los grupos amino cargados positivamente. Este resultado apoya la conjetura de que el modo de acción del quitosano como agente antimicrobiano es una secuencia de varios eventos que tienen lugar simultáneamente e implican a sus propiedades fisicoquímicas. El quitosano ChQ4, con alto GD y \overline{M}_η medio fue el más antimicrobiano, con mayor capacidad de agregación y más resistente, independientemente de la temperatura. Estas propiedades lo convierten en un candidato ideal para el desarrollo de recubrimientos antimicrobianos.

Bibliografía

- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry. In. Maryland, USA
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Alvarado, J. D., Almeida, A., Arancibia, M., Carvalho, M. A., Sobral, P. J. A., & Habitante, A. M. (2007). Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables. *Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada*, 64, 605–611.
- Allan, C. R., & Hadwiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3(3), 285-287.
- Bégin, A., & Van Calsteren, M.-R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63-67.
- Brody, A. L., Strupinsky, E., & Kline, L. R. (2010). *Active packaging for food applications* (Vol. 6): CRC press, 162-165.
- Chattopadhyay, D., & Inamdar, M. S. (2011). Aqueous behaviour of chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 2010, 1-7.
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39-47.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981-1014.

- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71(2–3), 235-244.
- Jeon, Y.-J., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71-76.
- Kendra, D. F., & Hadwiger, L. A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, 8(3), 276-281.
- Kim, K. W., Min, B., Kim, Y.-T., Kimmel, R. M., Cooksey, K., & Park, S. (2011). Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 565-569.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- Lalaleo, L. (2010). *Desarrollo de un método para la obtención de quitosano a partir de caparzones de camarón (Penaeus vannamei) utilizando un agente reductor químico*. Trabajo de fin de Carrera, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador, 170 p.
- Leceta, I., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 339-346.
- Liu, N., Chen, X.-G., Park, H.-J., Liu, C.-G., Liu, C.-S., Meng, X.-H., & Yu, L.-J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 60-65.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005a). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, E. (2005b). A Functional Chitosan-Enriched Fish Sausage Treated by High Pressure. *Journal of food science*, 70(3), M166-M171.
- Moore, G. K., & Roberts, G. A. F. (1980). Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(2), 115-116.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Byun, H.-G., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2004). Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of microbiology and biotechnology*, 14(2), 317-323.
- Richter, S., Boyko, V., & Schröter, K. (2004). Gelation Studies on a Radical Chain Cross-Linking Copolymerization Process: Comparison of the Critical Exponents Obtained by Dynamic Light Scattering and Rheology. *Macromolecular rapid communications*, 25(4), 542-546.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat science*, 62(2), 165-177.
- Scanlan, J. C., & Winter, H. H. (1991). Composition dependence of the viscoelasticity of end-linked poly (dimethylsiloxane) at the gel point. *Macromolecules*, 24(1), 47-54.
- Tang, Y.-F., Du, Y.-M., Hu, X.-W., Shi, X.-W., & Kennedy, J. F. (2007). Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 491-499.

- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.
- Yamada, K., Chen, T., Kumar, G., Vesnovsky, O., Topoleski, L. T., & Payne, G. F. (2000). Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue. *Biomacromolecules*, 1(2), 252-258.
- Zheng, L.-Y., & Zhu, J.-F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.
- Zhong, Y., Song, X., & Li, Y. (2011). Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 335-342.
- Zhou, N., & Mulvaney, S. (1998). The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2561-2571.
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1), M45-M51

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Resumen

En este trabajo se recuperó material activo, como concentrados e hidrolizados proteicos y un extracto de carotenoides, a partir de residuos del procesamiento de langostinos *Litopenaeus vannamei* (cabezas y exoesqueletos) y se caracterizaron en base a su composición química y propiedades antioxidantes (capacidad de reducción del hierro férrico, FRAP y capacidad de captación de radicales, ABTS). Además se prepararon diferentes soluciones en base a quitosano, obtenido a partir del material quitinoso residual, disuelto en ácido láctico, en combinación con los diversos materiales recuperados. De las soluciones se evaluó su viscosidad y propiedades antioxidantes y antimicrobianas frente a 26 cepas microbianas. Todas las soluciones mostraron una gran capacidad antioxidante y una menor viscosidad en comparación con la solución de quitosano. La incorporación del concentrado proteico, rico en astaxantina, aumentó la capacidad antimicrobiana de la mezcla, si bien este efecto no se observó con la adición del extracto de carotenoides.

Palabras clave: *residuos de langostino, coberturas de quitosano, concentrado proteico, astaxantina, antioxidante, antimicrobiano.*

Introducción

La industria de procesamiento de crustáceos genera una significativa cantidad de residuos (principalmente cabezas y exoesqueletos), que representan del 50 al 70% del material original (De Holanda y Neto, 2006). Además de una disminución significativa en el rendimiento, la eliminación y gestión ambiental de este tipo de residuos con frecuencia implica costes económicos adicionales. Los residuos de crustáceos son la mayor fuente de quitina o de su derivado desacetilada, el quitosano, cuyo proceso de aislamiento implica etapas como la desproteinización, desmineralización y blanqueo (Gildberg y Stenberg, 2001). El quitosano ha sido ampliamente estudiado por sus muchas aplicaciones industriales y recientemente por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y propiedades filmogénicas (Coma *et al.*, 2002; Friedman y Juneja, 2010). Además del material quitinoso, los restos de cabezas y exoesqueletos son también ricos en otros compuestos de alto valor nutricional y funcional, principalmente proteínas, lo que puede representar hasta un 40% del peso total de los residuos, así como de pigmentos carotenoides lipo-solubles, responsables del color rojo-anaranjado típico de los crustáceos (Bueno-Solano *et al.*, 2009; Cahú *et al.*, 2012). La obtención de hidrolizados de proteínas a partir de residuos de diferentes especies de langostino, que se utilizan como saborizantes de alimentos o para piensos en acuicultura, también ha recibido

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

considerable atención en la última década (Bueno-Solano *et al.*, 2009; De Holanda y Netto, 2006; Gildberg y Stenberg, 2001; Mizani, Aminlari, y Khodabandeh, 2005). Además, estos hidrolizados constituyen una fuente importante de péptidos antioxidantes (Guerard, Sumaya-Martinez, Laroque, Chabeaud, y Dufossé, 2007; Manni, Ghorbel-Bellaaj, Jellouli, Younes, y Nasri, 2010; Suetsuna, Ukeda, y Ochi, 2000). La recuperación de carotenoides a partir de residuos de crustáceos, principalmente astaxantina, ha sido ampliamente documentada (Armenta-López, Guerrero, y Huerta, 2002; Babu, Chakrabarti, y Surya Sambasivarao, 2008; De Holanda y Netto, 2006; Gildberg y Stenberg, 2001; Sánchez-Camargo, Almeida Meireles, López, y Cabral, 2011), y los carotenoides son bien conocidos por su alto poder antioxidante (Liñán-Cabello, Paniagua-Michel, y Hopkins, 2002; Sachindra y Bhaskar, 2008). Armenta y Guerrero-Legarreta (2009) mostró la estabilidad de un concentrado de carotenoproteínas procedente de residuos de langostinos *Litopenaeus vannamei*, rico en astaxantina, obtenido por fermentación láctica; sin embargo, en este trabajo no se hace referencia a sus propiedades antioxidantes. Dado que los carotenoides son muy inestables, han sido descritos diferentes métodos para aumentar su estabilidad, tales como la encapsulación con quitosano (Higuera-Ciapara, Felix-Valenzuela, Goycoolea, y Argüelles-Monal, 2004; Kittikaiwan, Powthongsook, Pavasant, y Shotipruk, 2007) o formulaciones basadas en lípidos (Gonnet, Lethuaut, y Boury, 2010). El quitosano posee capacidad de formación de película, por lo que puede utilizarse en forma de películas o recubrimientos para mejorar la calidad y extender la vida útil de los alimentos frescos y procesados. Además y con la finalidad de aumentar sus propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, las películas y recubrimientos de quitosano han sido enriquecidos con una variedad de compuestos activos, tales como aceites esenciales (Ojagh, Rezaei, Razavi, y Hosseini, 2010; Sánchez-González, Chiralt, González-Martínez, y Cháfer, 2011), extracto de té verde (Siripatrawan y Noipha, 2012), resveratrol (Pastor, Sánchez-González, Chiralt, Cháfer, y González-Martínez, 2013), ácido ascórbico (Sun, Liang, Xie Lei, y Mo, 2010), α -tocoferol (Georgantelis, Ambrosiadis, Katikou, Blekas, y Georgakis, 2007) o ácido oleico (Vargas, Albors, Chiralt, y González-Martínez, 2006). Sin embargo, hasta ahora, las películas o recubrimientos de quitosano no se han enriquecido con principios activos extraídos de los propios residuos de crustáceos, incluyendo astaxantina, para proporcionar una mayor funcionalidad.

El objetivo de este trabajo fue recuperar diversos tipos de materiales procedentes de residuos del procedo de langostino (*L. vannamei*) (cabezas y exoesqueletos), para su inclusión en la formulación de soluciones de quitosano a fin de mejorar sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

Materiales y métodos

Materiales

Los langostinos congelados *L. vannamei* (peso corporal alrededor de 40-50 g), proporcionado por Angulas Aguinaga Burgos (Burgos, España), se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización. Después de descongelar los langostinos, la cabeza y exoesqueletos se extrajeron de forma manual y se mantuvieron a 0 °C para utilizarse inmediatamente en la extracción de compuestos. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Recuperación de materiales activos

El esquema para la recuperación de los diferentes materiales a partir de los residuos de langostino se muestra en la Figura 1. Los residuos de langostino (cabeza y exoesqueleto) se suspendieron en agua (relación 1:1 p/v) y se sometieron a una autólisis por incubación a 40 °C durante 4 h con agitación constante. Después de la inactivación térmica a 80 °C durante 20 min, la suspensión con los residuos autolisados se mantuvo a 2 °C durante la noche. Con esta suspensión se llevó a cabo una primera extracción orgánica utilizando una mezcla de acetona: etanol (1:1 v/v) a 40 °C durante 2 h con agitación constante y una proporción de suspensión de residuos: disolvente de 1:3 (p/v). Después de 3 horas de decantación, se formaron tres fases bien definidas: I) fase superior, compuesta por un líquido transparente con un color amarillento, que se mantuvo a 2 °C y se mezcló con la fase orgánica obtenida de la fase II, II) fase intermedia, de color naranja intenso y opaca, de aspecto viscoso y III) material quitinoso, compuesto por restos de caparazón de color naranja. La fase intermedia (II) se filtró a través de un lienzo para separar el residuo sólido (material quitinoso), que se incorporó en el material recuperado de la fase III. La fase líquida resultante se sometió a extracciones orgánicas bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Las fases orgánicas obtenidas de las fases I y II se concentraron por rotaevaporación, con la obtención de un extracto de lípidos de color naranja intenso (CE), que se mantuvo a 40 °C en la oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno hasta su uso. La fase acuosa se centrifugó (10000 x g, 30 min, 5 °C); los sobrenadantes fueron descartados y el residuo sólido liofilizado constituyó el concentrado lipoproteico de la extracción de carotenoides PC_C. Parte de este concentrado fue suspendido en agua (2,5 % p/v) y se sometió a una hidrólisis con Alcalasa 2.4L (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) a 50 °C a pH 8,5 durante 3 h con una relación enzima: sustrato de 1:20 (p/p) usando un pH-estato (TIM 856, Radiómetro Analítica, Villeurbanne Cedex). La reacción fue detenida por inactivación de la enzima a 90 °C durante 10 min; el producto resultante se centrifugó a 5000 x g durante 15 min.

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

El sobrenadante se liofilizó y constituyó el hidrolizado proteico (HP_C), derivado de PC_C. El material quitinoso (recogido de las fases II y III) fue sometido a varios lavados con agua destilada y todo ello se filtró manualmente a través de una gasa. La fase líquida resultante se centrifugó (10000 x g, 30 min, 5 °C), y se descartó el sobrenadante. El precipitado se liofilizó y constituyó el concentrado lipoproteico PC_w. El material quitinoso lavado se sometió a una desmineralización con ácido láctico (75,6 g/L), en una relación de 1:3 (p/v), durante 36 horas a 21 °C. Para la eliminación de proteínas, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con Viscozyme® L (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) (pH 4,5, 50 °C) seguido por una hidrólisis con Alcalasa 2.4L (pH 8,5, 50 °C), utilizando un pH-estato. Después de la inactivación enzimática (90 °C, 10 min), la fracción acuosa se recuperó y se centrifugó a 5000 x g durante 15 min, el precipitado fue liofilizado para constituir el HP_{ch}, hidrolizado de proteína, derivado del material quitinoso lavado y desmineralizado. El residuo sólido se sometió a un proceso de desacetilación con 40 % de NaOH durante 4 horas a 110 °C. Después el material fue filtrado, lavado y secado a 45 °C, el sólido constituye el quitosano Ch40, que tuvo un contenido de nitrógeno de 7,18% y un grado de desacetilación de 84% (determinado por espectroscopia de infrarrojo, según Khan, Peh, y Ch'ng (2002).

Preparación de las soluciones de quitosano

El quitosano (2% p/p) se disolvió en ácido láctico 0,15 M con agitación constante durante la noche hasta su completa disolución. Los PC_C, PC_w, HP_{ch}, HP_C y CE (1% p/p) también se dispersaron en ácido láctico 0,15 M. La solución control de Ch40 se obtuvo tras añadir ácido láctico 0,15 M en el quitosano disuelto (1:1 p/p) hasta una concentración final de 1%. Las otras soluciones se prepararon mezclando la solución de quitosano con las soluciones de PC_C, PC_w, HP_{ch}, HP_C y CE hasta 0,5% (p/p), respectivamente. La concentración de quitosano, CE y PC_C en la solución más compleja (Ch40-CE-PC_C) fue 1%, 0,5% y 0,5% p/p, respectivamente. Todas las soluciones fueron sometidas a ultrasonidos (Qsonica, CT, EEUU) durante 1 min a 100% de amplitud. El pH final de las soluciones fue de 3,2.

Análisis proximal y pH

El contenido de humedad y de ceniza se analizó por triplicado según AOAC (2002). El contenido de nitrógeno/proteína de cada muestra se determinó en un analizador LECO FP-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI, EEUU), utilizando el factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25. El contenido de grasa se determinó (por triplicado) según el método de Bligh y Dyer

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

(1959). El pH se analizó con un pHmetro MeterLab pHM 93 (Radiometer Analytical, Dinamarca) homogenizando 1 mL de muestra en 10 mL de agua destilada.

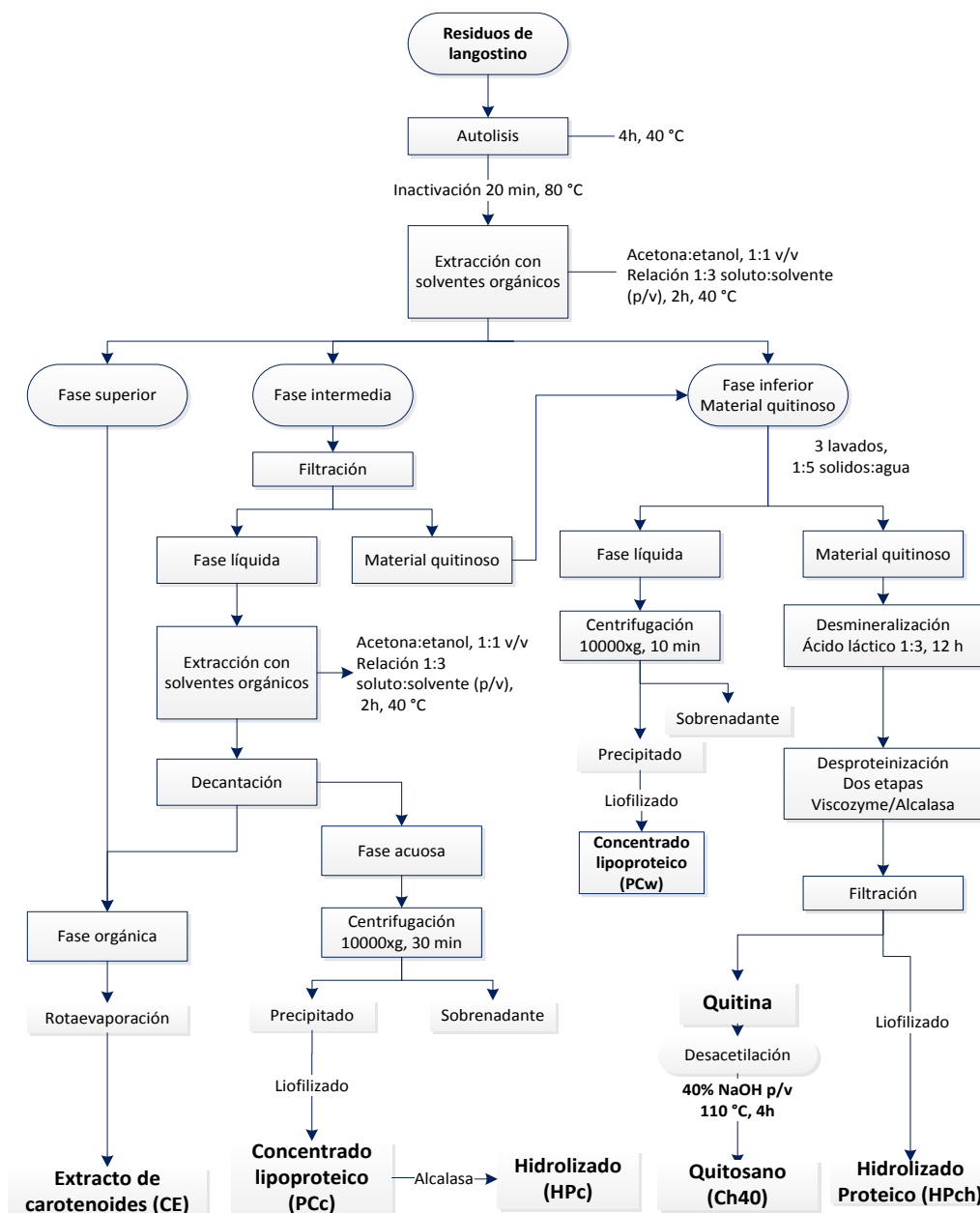


Figura 1. Esquema de la obtención de concentrados lipoproteicos (PCc y PCw), hidrolizados proteicos (HPc y HPch), extracto de carotenoides (CE) y quitosano a partir de cabezas y exoesqueletos de *L. vannamei*.

Contenido de minerales

Las muestras (por triplicado) se prepararon a través de una digestión ácida con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (Panreac) en un recipiente cerrado por microondas (Microwave

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Digestion LabStation, Milestone Inc. Shelton, EEUU). El contenido mineral de iones de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, manganeso, hierro y cobre se cuantificó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, modelo 5100 PC, Norwalk, Connecticut, EEUU) en módulo llama (acetileno-aire).

Contenido de glucosa y glicerol

El análisis de glucosa y glicerol en el concentrado PCc, que presentó la mayor actividad antioxidante, se llevó a cabo por triplicado mediante cromatografía iónica en un Bioscan 817 (Metrohm AG, Suiza) equipado con un detector amperométrico de pulsos (PAD) con electrodo de oro. La columna empleada fue Metrosep Carb (1-250/250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula). El concentrado PCc se diluyó en agua (4% p/v), con agitación por 30 min, y se filtró a través de un papel de filtro Whatman Nº 1, y a continuación a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm. La muestra se inyectó utilizando un auto-muestreador (modelo 838 Advanced Sample Processor, Metrohm AG) con una velocidad de flujo de 1 mL/min, utilizando 100 mM de NaOH como fase móvil. La glucosa y el glicerol se identificaron comparando sus tiempos de retención con sus respectivos patrones (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la cuantificación se realizó a partir de la normalización del área de los picos.

Contenido de astaxantina

Las muestras PCc y HPc fueron sometidas a una extracción con una mezcla acetona/etanol (1/1) en una proporción soluto/solvente de 1/10, y se mantuvieron bajo agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente en completa oscuridad; el solvente fue recuperado y la extracción se repitió. El solvente orgánico que contenía los carotenoides se evaporó a vacío a temperatura ambiente. La muestra seca se mantuvo en la oscuridad en atmósfera de nitrógeno a -40 °C hasta posterior análisis.

El extracto lipídico rico en carotenoides (CE) y los extractos lipídicos obtenidos de PCc y HPc se diluyeron con hexano hasta un volumen conocido y se midió la absorbancia de los extractos a 470 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 (Beckman Coulter, Indianapolis, EEUU). La concentración de astaxantina fue calculada utilizando la ecuación descrita por Britton (1995),

$$\text{Astaxantina (mg)} = A_{470\text{nm}} \times V \times 597/e$$

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Donde A es la absorbancia, V es el volumen de la dilución (mL), 597 es el peso molecular de la astaxantina y e es el coeficiente de absorción molar = 125100, valor documentado por Britton (1995) para la astaxantina disuelta en hexano.

Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó por hidrólisis directa en tubos de vidrio sellados al vacío a 110 °C durante 24 h con HCl 6N y 0,1% de fenol con norleucina (Sigma-Aldrich, Inc.) como patrón interno según descrito anteriormente por (Alemán, Giménez, Pérez-Santín, Gómez-Guillén, y Montero, 2011). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados expresados como la media con su desviación estándar, siendo en todos los casos menor al 6%.

Actividad antioxidante

Las muestras liofilizadas (PCc, PCw, HPch, HPc) y el extracto de carotenoides (CE) se suspendieron en agua destilada, agitados durante 30 min y filtrados a través de un papel filtro Whatman Nº 1.

Ensayo ABTS

Se determinó la capacidad de captura de radicales del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) según el método descrito por Alemán *et al.*, (2011). Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante equivalente de ácido ascórbico (mg/g o L de muestra) basados en una curva patrón de calibración de vitamina C. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Ensayo FRAP

El poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) se llevó a cabo como se describió previamente por (Alemán *et al.*, 2011). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ equivalente/g o L de muestra en base a una curva patrón de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Propiedades antimicrobianas de las soluciones de quitosano

La actividad antimicrobiana de las soluciones de quitosano se determinó por el método de difusión en placa de agar previamente descrito por (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010) utilizando discos de papel (5 mm de diámetro,

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Whatman N°1), impregnados con 40 µL de cada solución, a pH 3 y pH 5 y dispuestas sobre la superficie de placas con agar previamente inoculadas con el microorganismo problema. Como control se utilizaron discos con una solución de ácido láctico 0,15M. La actividad se evaluó frente a 26 cepas microbianas seleccionadas por su importancia en la salud (como microorganismos probióticos o patógenos) o por ser responsable del deterioro de alimentos. Las cepas se obtuvieron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Después de la incubación, se midió el diámetro de inhibición (considerada la actividad antimicrobiana) utilizando el programa informático Corel Draw X6. Los resultados se expresaron como mm de inhibición del crecimiento (proporción de magnificación 1:10). Cada determinación se realizó por duplicado.

Viscosidad de las soluciones de quitosano

La viscosidad de las soluciones se determinó a 25 °C utilizando un reómetro Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK) con una geometría cono-plato (ángulo de cono 4°, gap 0,15 mm), a una velocidad de cizalla constante de 0,5 s⁻¹. Los resultados son el promedio de cinco determinaciones y fueron expresadas en mPa·s.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS® (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL., EEUU) mediante un análisis de varianza de una vía. La comparación entre los pares de medias se realizó con una prueba de Tukey-b a un nivel de significancia de $P \leq 0,05$.

Resultados y discusión

Rendimientos

La porción de material comestible de los langostinos (músculo) tuvo un rendimiento del 54%, esto significa que el 46% restante corresponde a los residuos. Rendimientos similares se han obtenido previamente en langostinos del género *Penaeus* (Armenta-López *et al.*, 2002; Sachindra, Bhaskar, y Mahendrakar, 2006). Además del uso de los residuos como fuente de quitina para la producción de quitosano (Ch40), (Fig. 1), otros materiales de naturaleza proteica (concentrados PCc y PCw e hidrolizados HPc y HPch) y carotenoides (CE) se recuperaron, y sus propiedades (antioxidantes y antimicrobianas) fueron estudiadas. Inicialmente, 4 Kg de residuo húmedo (humedad= 70,45 ± 1,87 %) dio como resultado 12,1 g de PCw, 54,1 g of PCc, y 4,81 g de HPch, que en base seca representan un rendimiento de 1,02%, 4,58%, and 0,41%, respectivamente (Tabla 1).

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Tabla 1. Análisis proximal del material de desecho (PCc, PCw, HPch)

	Rendimiento ^a (%)	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	Carbohidratos y otros ^b
PCc	4,58	0,63 ± 0,10a	42,27 ± 0,18a	11,48 ± 0,01 ^a	29,38 ± 1,16a	16,24
PCw	1,02	0,91 ± 0,13a	22,00 ± 0,30b	39,73 ± 1,05b	20,75 ± 0,09b	16,61
HPch	0,41	0,61 ± 0,50 ^a	60,70 ± 0,45c	8,21 ± 0,54c	26,89 ± 1,86c	3,59

Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las muestras.

^a g por 100 g de desperdicios en base seca

^b calculado por diferencia

El rendimiento de astaxantina en el extracto CE fue de 60 mg/kg de residuo húmedo. El contenido de astaxantina en los crustáceos puede variar considerablemente, dependiendo de la especie y el procedimiento de extracción (De Holanda y Netto, 2006). Armenta-López *et al.*, (2002) obtuvo un rendimiento de astaxantina libre de 0,96-1,25 mg/kg de residuos de cabezas de *Penaeus sp.*, que se incrementó a 47,92 mg/kg después de una hidrólisis enzimática y ultrafiltración. Cahú *et al.*, (2012) obtuvieron un rendimiento de 85 mg de astaxantina por kg de residuo de *L. vannamei* sometido a un proceso de autólisis. El color anaranjado intenso en el concentrado PCc sugiere que retiene un porcentaje significativo de carotenoides y que no forma parte por tanto del extracto de carotenoides, CE. Esto fue confirmado posteriormente, con la determinación del contenido de astaxantina en PCc, con un valor de 6,1 g por 100 g de polvo seco. Por otro lado, la hidrólisis de PCc con Alcalasa dio lugar a un hidrolizado proteico (HPch) con un contenido de 2,7 g de astaxantina por 100 g de polvo seco.

Composición

La composición proximal de los materiales liofilizados, ricos en proteína y obtenidos directamente del proceso de extracción (PCc, PCw y HPch) se encuentran en la Tabla 1. El concentrado recuperado a partir del agua de lavado del material quitinoso (PCw) tuvo un relativamente alto contenido de grasa (~40%), incluso superior que el contenido de proteína. Por otro lado, el concentrado PCc, que fue el más abundante, tuvo significativamente ($P \leq 0,05$) más proteína (42,3%) que PCw, y sin embargo menos que el hidrolizado derivado del material quitinoso lavado y desmineralizado (HPch) (60,7%). La suma de los porcentajes de humedad, proteína, grasa y contenido de cenizas genera una diferencia con respecto al 100%, que fue relativamente grande (~16%) en el caso de los concentrados PCc y PCw y mucho menor en el hidrolizado HPch (~4%), que podrían corresponder a la presencia de carbohidratos y otros componentes menores (Tabla 1). El contenido de ceniza en base seca en los tres materiales fue

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

elevado (21-29%), razón por la cual se realizó un análisis de los principales minerales (Tabla 2). El concentrado PCc tuvo un alto contenido de Ca (~122 g/kg) y un menor contenido de Mg (~5 g/kg), ambos significativamente altos ($P \leq 0,05$) en comparación con PCw. Las sales de calcio presentes en el exoesqueleto de los crustáceos forman parte de la estructura vesicular que contiene gran cantidad de pigmentos (Armenta-López *et al.*, 2002), esto explicaría el alto contenido de calcio en el concentrado PCc que además presentó una coloración naranja intensa.

Además se encontró un menor contenido de Na, K, Zn y Fe en ambos concentrados (PCc y PCw) así como también trazas de Cu y Mn. El hidrolizado HPch presentó menor contenido de minerales ($P \leq 0,05$) que se corresponde con un menor contenido de cenizas. La única excepción fue la presencia de iones de Na, cuya contenido probablemente se vio incrementado por la adición de NaOH utilizado para mantener el pH constante durante la hidrólisis, como fue observado previamente por Synowiecki y Al-Khateeb (2000).

Tabla 2. Contenido de minerales (mg/g) del material de desecho (PCc, PCw y HPch).

	Ca	Mg	Na	K	Zn	Fe	Cu	Mn
PCc	121,60 ± 0,85a	5,16 ± 0,14a	1,49 ± 0,12a	0,534 ± 0,011a	0,238 ± 0,031a	0,986 ± 0,033a	0,028 ± 0,003a	0,034 ± 0,000a
PCw	82,46 ± 4,31b	2,46 ± 0,14b	1,05 ± 0,38a	0,923 ± 0,029b	0,064 ± 0,003b	0,638 ± 0,033b	0,0027 ± 0,002a	0,022 ± 0,001b
HPch	2,51 ± 0,01c	0,14 ± 0,00c	62,38 ± 0,72b	0,087 ± 0,017c	0,018 ± 0,002c	0,100 ± 0,002c	<0,025	<0,015

Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las muestras

La composición de aminoácidos de PCc, PCw y HPch mostró la riqueza en aminoácidos esenciales y la marcada diferencia entre las muestras (Tabla 3). Los residuos más abundantes en los tres materiales fueron Asp, Glu y Gly, que en conjunto comprenden entre el 41-45% de todos los aminoácidos estudiados. Estos aminoácidos se han descritos como mayoritarios en varias especies de crustáceos (Rosa y Nunes, 2004). La suma de los residuos hidrofóbicos en PCw fue considerablemente mayor que en PCc (335‰ vs. 222‰) coincidente con el mayor contenido en lípidos en PCw. A su vez, el contenido de aminoácidos hidrofóbicos en PCw fue similar a HPch (342‰), lo que era de esperar pues ambos provienen de la misma fracción inicial (residuo del material quitinoso lavado). Por el contrario PCc fue rico en residuos hidrofílicos, especialmente Lys y Tyr. Un contenido considerable de taurina se encontró en PCc (0,72 g/kg) y en PCw (0,56 g/kg), sin embargo no se detectó en HPch. La taurina, ácido orgánico natural presente en muchos tejidos vivos y con importante actividad biológica, ha

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

sido previamente descrito en caldos de gambas y ostras (Cambero *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000).

Tabla 3. Composición en aminoácidos (%) en el material de desecho (PCc, PCw y HPch).

Aminoácido	PCc	PCw	HPch
Asp	176	160	124
Thr	28	37	32
Ser	67	85	98
Glu	152	110	126
Gly	121	137	165
Ala	67	83	116
Cys	10	21	11
Val	34	61	43
Met	9	14	6
Ile	19	34	19
Leu	33	60	33
Tyr	97	20	30
Phe	31	38	58
His	14	17	20
Lys	65	44	14
Arg	49	37	37
Pro	29	45	67
Σ Hidrofóbicos ^a	222	335	342

^a Ala, Leu, Ile, Val, Pro, Phe, Met

Propiedades antioxidantes de los materiales recuperados

La capacidad antioxidante de los diferentes materiales fue determinada por los métodos de ABTS (capacidad para captar radicales libres) y FRAP (capacidad de reducción del ión férrico) (Tabla 4). El concentrado PCc mostró valores de ABTS y FRAP mucho mayores ($P \leq 0,05$) que aquellos obtenidos en PCw, que coincide con un mayor contenido de proteína, la cual presumiblemente estará parcialmente hidrolizada en ambos concentrados por efecto de la autólisis. En este sentido se han documentado varios hidrolizados con actividad antioxidante obtenidos a partir de crustáceos, incluyendo aquellos del género *Penaeus sp.*, (Guerard *et al.*, 2007; Manni i cols., 2010). Además, la relativamente alta capacidad antioxidante de PCc podría estar relacionada con la presencia de compuestos antioxidantes no-proteicos, como azúcares reductores y carotenoides. La presencia de azúcares y alcoholes fue confirmada en PCc con un contenido considerable de glucosa (1,04 mg/g de polvo seco) y glicerol (9,48 mg/g de polvo

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

seco). Se ha documentado que la presencia de azúcares reductores y péptidos son los responsables de la capacidad antioxidante de los residuos de langostino tratados con quitinasas y proteasas de origen bacteriano (Wang, Chang y Liang, 2010). Por otro lado, la presencia de astaxantina en el concentrado PCc (6,1 mg/100 g de polvo seco) fue confirmada, tal como se ha descrito anteriormente. Los carotenoides tienen una gran tendencia a formar complejos covalentes con las proteínas (carotenoproteínas) y lípidos (como esterés) y por lo tanto se cree que son responsables de la brillante coloración naranja de PCc y de la gran actividad antioxidante. En este sentido, el poder antioxidante de los carotenoides hallados en crustáceos, especialmente astaxantina, es bien conocida (Liñán-Cabello *et al.*, 2012; Sachindra y Bhaskar, 2008). El concentrado PCc presentó valores de ABTS similares a los del hidrolizado HPch (producto de la desproteinización enzimática del material quitinoso lavado y desmineralizado), pero la habilidad reductora de HPch fue alrededor de tres veces mayor, posiblemente por la liberación de oligosacáridos del material quitinoso hidrolizado (Park y Kim, 2010). Los valores de ABTS y FRAP aumentaron ligeramente en el hidrolizado HPc (producto de la hidrólisis enzimática de PCc), y se atribuyó principalmente a la eficacia de la Alcalasa en la liberación de péptidos antioxidantes de cadena corta (Alemán *et al.*, 2011; Cheung, Cheung, y Li-Chan, 2012). La gran actividad antioxidante de HPc puede deberse también a la presencia residual de carotenoides (2,7 g/100 g de polvo seco), que pudieron haberse separado de la proteína durante la hidrólisis de PCc con Alcalasa (Armenta-López *et al.*, 2002; De Holanda y Netto, 2006). Por último, el extracto de carotenoides (CE) presentó valores de ABTS y FRAP aproximadamente 17 y 13 veces mayores respectivamente, que los del hidrolizado de proteínas (HPc), lo cual muestra claramente la mayor eficiencia antioxidante de los carotenoides en comparación con los péptidos.

Tabla 4. Propiedades antioxidantes de los materiales de desecho (PCc, PCw, HPch, HPc y CE).

	ABTS mg VCEAC/g	FRAP μ moles Fe Eq/g
PCc	75,60 \pm 0,77a	19,97 \pm 0,53a
PCw	2,50 \pm 0,34b	7,19 \pm 0,19b
HPch	78,97 \pm 1,46c	55,17 \pm 1,13c
HPc	171,3 \pm 0,2d	107,4 \pm 5,5d
CE	2954 \pm 26a	1381 \pm 7a

Letras diferentes (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las muestras.

^a excluido del análisis estadístico

Propiedades antioxidantes de las soluciones de quitosano

Las soluciones en base a 1% de quitosano disuelto en ácido láctico se elaboraron con la adición de varios materiales recuperados de los residuos de langostinos, con la excepción de PCw, que no presentó una alta capacidad antioxidante. La solución patrón de quitosano (Ch40) mostró poca capacidad antioxidante ABTS (35,68 mg VCEAC/L) y FRAP (66,22 μ mol Fe Eq./L). La capacidad del quitosano para secuestrar radicales libres se ha relacionado con el grado de exposición de los grupos amino como función de su peso molecular (Kim y Thomas, 2007). Los valores de ABTS y FRAP aumentaron significativamente ($P \leq 0,05$) después de la incorporación de cualquiera de los materiales activos recuperados (Tabla 5). De manera particular, los valores de ABTS se incrementaron cuando se añadió el extracto de carotenoides a la solución de quitosano (Ch40-CE), lo que concuerda con los resultados de actividad antioxidante obtenidos anteriormente para CE. Como es conocido, los carotenoides son moléculas inestables; sin embargo la emulsión formada por el quitosano y el extracto de carotenoides durante el proceso de homogenización favorece considerablemente su estabilidad (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004). No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en las soluciones que contenían PCc, HPch o HPc. Sorprendentemente, la solución más compleja, Ch40-CE-PCc presentó los valores de ABTS más bajos que el resto de soluciones ($P \leq 0,05$), sin embargo fue mayor que la solución de Ch40. Por otro lado, esta solución más compleja presentó una mayor capacidad reductora seguida por Ch40-PCc. Sin embargo, el concentrado PCc no fue el material con la mayor capacidad de poder reductor, lo que evidencia posibles interacciones del quitosano, un polielectrolito altamente reactivo, con los componentes de los diversos materiales que puede afectar significativamente la actividad antioxidante de la solución resultante.

Tabla 5. Propiedades antioxidantes de las soluciones de quitosano.

	ABTS mg VCEAC/L	FRAP μmoles Fe Eq/L
Ch40	35,68 \pm 4,31 ^a	66,22 \pm 6,94 ^a
Ch40+CE	151,2 \pm 1,1 ^b	564,0 \pm 3,3 ^b
Ch40+PCc	114,5 \pm 5,8 ^c	1141 \pm 27 ^c
Ch40+HPch	109,7 \pm 8,2 ^c	453,3 \pm 8,3 ^d
Ch40+HPc	103,8 \pm 1,3 ^c	711,2 \pm 2,6 ^e
Ch40+CE+PCc	80,17 \pm 2,45 ^d	1681 \pm 23 ^f

Letras diferentes (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las muestras.

Propiedades antimicrobianas de las soluciones de quitosano

La actividad antimicrobiana de las soluciones de quitosano obtenidas se vio afectada por el pH así como por el tipo de microorganismo. En general, la actividad antibacteriana de las soluciones aumenta cuando el pH disminuye. Por otra parte, en algunos casos el pH fue limitante para el crecimiento. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* no mostraron actividad frente a la solución de quitosano a pH 5 (Tabla 6). Algunos autores observaron mayor actividad antimicrobiana en Ch40 a un pH inferior (No, Park, Lee, y Meyers, 2002) y su actividad estuvo relacionada con el grupo funcional activo NH^{3+} (Chung y Chen, 2008). El quitosano muestra una disminución en la actividad antibacteriana con el aumento del pH debido a la presencia mayoritaria de grupos amino sin carga, así como a su escasa solubilidad (Aiedeh y Taha, 2001; Sudarshan, Hoover, y Knorr, 1992). En el presente trabajo, el quitosano mostró actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero no fue activo contra levaduras y mohos (Tabla 6). En este sentido, Jeon, Park, y Kim (2001) observaron que el quitosano fue más eficaz contra las bacterias Gram-positivas que Gram-negativas.

La incorporación del concentrado de proteína (PCc) aislado durante el proceso de recuperación de materiales a partir de residuos, tal como se describió anteriormente (Fig. 1), incrementa la actividad antibacteriana en la solución resultante. El proceso de recuperación incluye una etapa de autólisis, y por lo tanto algunas fracciones de péptidos con capacidad antimicrobiana podrían ejercer su actividad. Algunos péptidos lineales enriquecidos con alta proporción de residuos específicos, particularmente arginina, prolina, glicina, triptófano, o histidina, pueden mostrar un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias, hongos y protozoos (Rosa y Barracco, 2010). Los aminoácidos mencionados se encontraron en el material proteico obtenido de residuos en el presente estudio (Tabla 3).

Los péptidos antimicrobianos han sido descritos en su naturaleza catiónica, anfipática con bajo peso molecular (por lo general con menos de 10 kDa) y una gran proporción de residuos hidrofóbicos (Azmi *et al.*, 2013; Dürr, Sudheendra, y Ramamoorthy, 2006). A pesar del gran porcentaje de residuos hidrofóbicos en los materiales de desecho PCw y HPch, esas fracciones no mostraron actividad antimicrobiana (datos no mostrados).

En general, la actividad antimicrobiana aumentó en Ch40-PCc con respecto a Ch40, especialmente a pH 3 (por ejemplo, *Clostridium perfringens*) y en algunos casos (por ejemplo, *Listeria innocua*) hubo actividad antimicrobiana en Ch40-PCc cuando el Ch40 no presentó ninguna actividad (Tabla 6). A pH ácido, tanto la proteína como el quitosano podrían estar

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

cargados positivamente (Devlieghere, Vermeulen, y Debevere, 2004) y así interactuar con mayor eficacia con la carga negativa residual de la superficie de las células bacterianas, lo que altera la integridad de la membrana del microorganismo y por lo tanto mejora el efecto antimicrobiano. El aumento en la actividad antimicrobiana en Ch40-PCc se perdió parcialmente a pH 5 (por ejemplo, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) como se describió anteriormente.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana cuantitativa (mm) de las soluciones de quitosano.

Microorganismo	Ch40		Ch40+CE		Ch40+PCc		Ch40+CE+PCc		Ch40+CE+PCc	
	pH 3	pH 5	pH 3	pH 5	pH 3	pH 5	pH 3	pH 5	pH 3	pH 5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	186,5 ± 17,7	169 ± 0,71	-	140 ± 0,00	182 ± 32,53	154 ± 7,1	207 ± 28,00	141 ± 1,24	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	188 ± 1,44	-	-	168 ± 39,60	-	188 ± 21,2	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	279 ± 1,47	186 ± 1,44	-	-	192 ± 33,23	169 ± 14,1	168 ± 7,07	141 ± 21,41	-	-
<i>Bifidobacterium animalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	197 ± 1,40	187 ± 12,4	-	-	188 ± 1,41	139 ± 14,1	-	-	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	139 ± 1,41	164 ± 33,23	-	142 ± 2,82	154 ± 20,0	146 ± 8,50	169 ± 1,41	150 ± 7,00	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	186 ± 2,51	150 ± 2,75	-	-	178 ± 13,44	-	167 ± 17,4	169 ± 1,41	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	159 ± 0,00	140 ± 0,00	139 ± 11,4	140 ± 7,70	210 ± 32,53	154 ± 19,8	191 ± 5,65	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	196 ± 52,3	187 ± 0,00	-	141 ± 14,1	187 ± 26,16	151 ± 2,12	169 ± 3,53	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	178 ± 13,44	-	150 ± 1,40	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	188 ± 14,1	151 ± 2,83	-	154 ± 8,5	192 ± 9,35	-	189 ± 3,56	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	164 ± 6,36	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	168,5 ± 1,70	-	-	-	140 ± 0,00	-	170 ± 3,00	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	186 ± 11,4	167 ± 2,12	-	-	208 ± 3,45	-	217 ± 35,36	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	191,5 ± 6,36	178 ± 13,44	-	150 ± 17,41	187 ± 0,00	-	178 ± 2,12	150 ± 1,40	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	167,5 ± 0,707	141 ± 10,4	-	-	164 ± 5,82	153 ± 5,0	190 ± 3,53	-	-	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	-	-	159 ± 0,71	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	158,5 ± 13,43	-	-	150 ± 2,12	192 ± 3,90	144 ± 6,56	190 ± 53,6	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	159 ± 0,00	-	148 ± 2,21	-	159,0 ± 0,00	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	186,5 ± 0,71	-	-	-	188 ± 41,1	143 ± 4,53	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	160,5 ± 2,12	-	-	-	164 ± 3,62	-	189 ± 15,6	-	-	-

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Por otro lado, cuando el extracto de carotenoides (CE) se incluyó en la formulación de Ch40 o de Ch40-PCc se observó una ligera disminución en la actividad antimicrobiana. Además algunos microorganismos no fueron sensibles a Ch40-CE (por ejemplo, *P. aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis*). Este hecho podría atribuirse a una competencia por las cargas positivas en Ch40 y/o Ch40-PCc entre CE y la carga negativa de la membrana celular de los microorganismos. La actividad antimicrobiana de extracto de carotenoides de los residuos (plumas) de la especie *Gallus gallus* frente a *Escherichia coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae* ha sido descrita anteriormente (Priya y Maheswari, 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren una secuencia de eventos moleculares que tienen lugar de forma simultánea y sucesiva, lo que indica que el modo de acción antimicrobiana de quitosano, especialmente cuando se combina con otros compuestos, no es un único mecanismo.

Viscosidad de las soluciones de quitosano

La homogeneización de la solución de quitosano con los diversos materiales recuperados dio como resultado en todos los casos emulsiones altamente estables de aspecto uniforme y de color ligeramente anaranjado y con valores de viscosidad que las hicieron adecuadas para la aplicación en la superficie del alimento en forma de una capa de recubrimiento muy delgada. El quitosano disuelto en ácido láctico (1%, pH 3) originó una solución con una viscosidad de 145 mPa·s (Tabla 7). La incorporación de cualquier material activo dio lugar a una reducción significativa en la viscosidad ($P \leq 0,05$), en especial tras la adición de los hidrolizados. No se encontraron diferencias significativas en la viscosidad de las soluciones Ch40-CE, Ch40-PCc y entre la solución más compleja Ch40-CE-PCc. Al mezclar el quitosano con los diversos tipos de materiales se puede modificar las propiedades reológicas de la solución de forma diferente, dependiendo del tipo de compuestos y el grado de interacción con las moléculas de quitosano, así como también el grado de interferencia durante la agregación intrínseca del quitosano.

Tabla 7. Viscosidad de las soluciones de quitosano.

	Viscosidad mPa·s
Ch40	145 ± 1,7a
Ch40 + CE	69,0 ± 1,4b
Ch40 + PCc	72,1 ± 2,1b
Ch40 + HPch	38,5 ± 1,6c
Ch40 + HPc	35,2 ± 1,4c
Ch40 + CE + PCc	70,2 ± 1,8b

Letras diferentes (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las muestras.

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

Por ejemplo, algunos autores han observado que la adición de un extracto de *murta*, rico en flavonoides, a una solución de quitosano produce un aumento muy pronunciado en la viscosidad, el cual se atribuye a las excesivas interacciones a través de enlaces de hidrógeno entre el quitosano y los polifenoles (Silva-Weiss, Bifani, el DIH, Sobral, y Gómez-Guillén, 2013). Por el contrario, la adición de sales minerales impide la auto-agregación del quitosano, causando una disminución notable de la viscosidad (Park y Zhao, 2004). En el caso de los materiales incorporados en el presente estudio, tanto los péptidos hidrolizados como los compuestos hidrofóbicos presentes en CE y en PCc, podrían interferir con las interacciones intra e intermoleculares de quitosano, produciendo una disminución notable en el comportamiento viscoso de las soluciones.

Conclusiones

Una serie de materiales activos procedentes de residuos de langostino, que incluyen concentrados lipoproteicos, hidrolizados proteicos y un extracto de carotenoides, aumentaron considerablemente las propiedades antioxidantes de soluciones a base de quitosano. La incorporación de un concentrado rico en proteína y astaxantina en una solución de quitosano condujo a un aumento de su capacidad antimicrobiana, que no se observó una vez que se adicionó el extracto de carotenoides. Ninguno de los materiales probados tuvo un efecto negativo en el comportamiento viscoso de las soluciones lo que podría haber imposibilitado su aplicación como una capa de recubrimiento.

Bibliografía

- Aiedeh, K., & Taha, M. O. (2001). Synthesis of iron-cross-linked chitosan succinate and iron-cross-linked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 159-168.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Armenta, R. E., & Guerrero-Legarreta, I. (2009). Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry*, 112, 310-315.
- Armenta-López, R., Guerrero, I., & Huerta, S. (2002). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*, 67(3), 1002-1006.
- Azmi, S., Srivastava, S., Mishra, N. N., Tripathi, J. K., Shukla, P. K., & Ghosh, J. K. (2013). Characterization of antimicrobial, cytotoxic, and antiendotoxin properties of short

- peptides with different hydrophobic amino acids at “a” and “d” positions of a heptad repeat sequence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 924-939.
- Babu, C. M., Chakrabarti, R., & Surya Sambasivarao, K. R. (2008). Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT & Food Science and Technology*, 41(2), 227-235.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Britton, B. (1995). UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, y H. Pfander (Eds.), Carotenoids. Volume 1B: *Spectroscopy* (pp. 56-57). Berlin: Birkhäuser Verlag.
- Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O. N., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N. P., & Sánchez-Machado, D. I. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112(3), 671-675.
- Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho, L. B., *et al.* (2012). Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47(4), 570-577.
- Cambero, M. I., Jaramillo, C. J., Ordoñez, J. A., Cobos, A., Pereira-Lima, C. I., & García de Fernando, G. D. (1998). Effect of cooking conditions on the flavour compounds and composition of shrimp (*Parapenaeus longirostris*) broth. *European Food Research and Technology*, 206(5), 311-322.
- Cheung, L. K. Y., Cheung, I. W. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2012). Effects of production factors and egg-bearing period on the antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6823-6831.
- Chung, Y. C., & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acidsoluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99, 2806-2814.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162-1169.
- De Holanda, H. D., & Netto, F. M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 71(5), C298-C303.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714.
- Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1408-1425.
- Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737-1761.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*, 76(1), 172-181.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 809-812.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Gonnet, M., Lethaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A., & Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42(11), 1486-1491.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. M., & Argüelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 41-45.
- Jeon, Y.-J., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71-76.
- Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 205-212.
- Kim, D. S., Baek, H. H., Ahn, C. B., Byun, D. S., Jung, K. J., Lee, H. G., et al. (2000). Development and characterization of a flavoring agent from oyster cooker effluent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4839-4843.
- Kim, K. W., & Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101(1), 308-313.
- Kittikaiwan, P., Powthongsook, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. *Carbohydrate Polymers*, 70(4), 378-385.
- Liñán-Cabello, M. A., Paniagua-Michel, J., & Hopkins, P. M. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 8(4), 299-309.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Mizani, M., Aminlari, M., & Khodabandeh, M. (2005). An effective method for producing a nutritive protein extract powder from shrimp-head waste. *Food Science and Technology International*, 11(1), 49-54.
- No, H., Park, N., Lee, S., & Meyers, S. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 65-72.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193-198.
- Park, B. K., & Kim, M.-M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5152-5164.
- Park, S.-I., & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933-1939.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Cháfer, M., & González-Martínez, C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 272-280.
- Priya, S., & Maheswari, P. (2012). Carotenoids from the feathers waste of *Gallus gallus* and its antimicrobial activity. *Pollution Research*, 31(4), 507-509.
- Rosa, R. D., & Barracco, M. A. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 7, 262-284.
- Rosa, R., & Nunes, M. L. (2004). Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(1), 89-94.
- Sachindra, N. M., & Bhaskar, N. (2008). In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. *Bioresource Technology*, 99(18), 9013-9016.

Capítulo 2. Soluciones antioxidantes y antimicrobianas de quitosano enriquecidas con materiales activos procedentes de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*)

- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26(10), 1092-1098.
- Sánchez-Camargo, A. P., Almeida Meireles, M. A., Lopes, B. L. F., & Cabral, F. A. (2011). Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *Journal of Food Engineering*, 102(1), 87-93.
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 246-253.
- Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with *murta* leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 458-466.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102-108.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257-272.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(3), 128-131.
- Sun, D., Liang, G., Xie, J., Lei, X., & Mo, Y. (2010). Improved preservation effects of litchi fruit b& combining chitosan coating with ascorbic acid treatment during postharvest storage. *African Journal of Biotechnology*, 9(22), 3272-3279.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68(2), 147-152.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 164-171.
- Wang, S.-L., Chang, T.-J., & Liang, T.-W. (2010). Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. *Biodegradation*, 21(3), 321-333.

Capítulo 3. Biotransformación de quitina en quitosano mediante la utilización de enzimas procedentes de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor roxii*

Resumen

La quitina desacetilasa, enzima que cataliza la hidrólisis de los grupos acetamido en la quitina, se obtuvo a partir de extractos crudos del micelio de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*. Durante la desacetilación, la quitina desacetilasa no presentó actividad frente al sustrato quitina y fue necesario realizar un pretratamiento con ácido fórmico o metanol para hacerla amorfa. Sin embargo únicamente se consiguió una desacetilación máxima del ~9% cuando se utilizó extractos crudos procedentes de *M. rouxii*. Al pretratar la quitina con NaOH (30% p/v) durante 1 h a 100 °C y someterla a una desacetilación con los extractos crudos de quitina-desacetilasa, el grado de desacetilación se incrementó en un 20-30%, especialmente con los extractos enzimáticos de *C. lindemuthianum*.

Palabras clave: Quitina, quitosano, desacetilasa, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*

Introducción

La quitina es un polisacárido compuesto principalmente por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) presentes en el exoesqueleto de crustáceos, cutícula de algunos invertebrados o la pared celular de ciertos hongos (Cohen, 2010). El quitosano, polisacárido lineal semicristalino, se compone por unidades de (1→4)-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucano (N-acetil-D-glucosamina) y (1→4)-2-amino-2-deoxi-β-D-glucano (D-glucosamina) y es el derivado desacetilado de la quitina (Rinaudo, 2006). El quitosano se obtiene de la quitina aislada a partir de los caparazones de crustáceos por un proceso de desacetilación química alcalina a elevadas temperaturas (Abdou, Nagy, y Elsabee, 2008; P. Beaney, Lizardi-Mendoza, y Healy, 2005; Dash, Chiellini, Ottenbrite, y Chiellini, 2011). El proceso químico de obtención de quitosano implica un consumo significativo de álcali a elevada fuerza iónica (Tsaih y Chen, 2003; Nemtsev, Gamzazade, Rogozhin, Bykova, y Bykov, 2002) y permite la obtención de quitosano con un alto grado de desacetilación, pero compromete su calidad por efecto de la depolimerización del esqueleto de quitina (Chebotok, Novikov, y Konovalova, 2006; Prashanth y Tharanathan, 2007). Además, el proceso es difícil de controlar y es contaminante para el medio ambiente (Haki y Rakshit, 2003).

La biotransformación de la quitina en quitosano mediante enzimas es una alternativa controlada y menos agresiva que el proceso químico, y se puede llevar a cabo en condiciones ambientales sin tener que utilizar reactivos corrosivos asociados con impactos negativos medioambientales (Beaney, Gan, Magee, Healy, y Lizardi-Mendoza, 2007; Kafetzopoulos, Martinou, y Bouriotis, 1993). La quitina-desacetilasa (CDA, EC 3.5.1.41), enzima que cataliza la

Capítulo 3. Biotransformación de quitina en quitosano mediante la utilización de enzimas procedentes de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*

hidrólisis de los grupos acetamino de la quitina, se obtiene de hongos como el *Colletotrichum lindemuthianum* (Kauss, Jeblick, y Young, 1983; Tokuyasu, Ono, Ohnishi-Kameyama, Hayashi, y Mori, 1997; Tsigos y Bouriotis, 1995), *Absidia coerulea* (Gao, Katsumoto, y Onodera, 1995) y *Mucor rouxii* (Araki y Ito, 1975; Martinou, Kafetzopoulos, y Bouriotis, 1995). Esta enzima cataliza la desacetilación de los monómeros de la acetil-glucosamina en la quitina a través de un mecanismo de ataque múltiple (Tsigos, Martinou, Kafetzopoulos, y Bouriotis, 2000).

La desacetilación de la quitina con la enzima quitina desacetilasa aumenta linealmente con el incremento de unidades acetiladas en el quitosano hidrosoluble parcialmente acetilado (Aggeliki Martinou, Bouriotis, Stokke, y Vårum, 1998). Sin embargo, al ser el quitosano un polímero semicristalino (Rinaudo, 2006), la enzima difícilmente puede acceder a la cadena polimérica de la quitina, por lo que es necesario tratarla con métodos físicos o químicos para facilitar la desacetilación (Martinou, Kafetzopoulos, y Bouriotis, 1995).

El objetivo de la presente investigación fue utilizar enzimas microbianas, como alternativa al método químico tradicional, para desacetilar la quitina biológicamente aislada de caparazones de langostino y transformarla en quitosano, manteniendo su funcionalidad.

Materiales y métodos

Materiales

Las cepas de *Mucor rouxii* (CECT 2655) y *Colletotrichum lindemuthianum* (CECT 2119) se adquirieron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Todos los reactivos químicos y medios de cultivo se utilizaron sin purificación previa y fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, Mo., USA) y por Oxoid (Basingstoke, UK), respectivamente.

Obtención de quitina

La quitina se obtuvo a partir de residuos de crustáceos (*Litopenaeus vannamei*, cabeza y cefalotórax) suministrados por Angulas Aguinaga Burgos (Burgos, España). Los exoesqueletos se suspendieron en agua (relación 1:1, p/v) y se sometieron a un proceso de autólisis a 40 °C durante 4h con agitación constante. Después de la inactivación térmica a 80 °C durante 20 min, los residuos se mantuvieron en refrigeración a 2 °C durante 12 horas. A continuación, los sólidos se separaron a través de un lienzo fino para aislar el material quitinoso, que posteriormente se sometió a una desmineralización láctica (75,6 g/L), relación 1:3 (p/v) a 21 °C

durante 36 h. El residuo sólido se desproteinizó mediante hidrólisis enzimática con Viscozyme® L (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) (pH 4,5; 50 °C), seguida de una hidrólisis con Alcalasa 2.4L (pH 8,5; 50 °C), utilizando un pH-stato. La inactivación enzimática se realizó a 90 °C durante 10 min (Arancibia *et al.*, 2014).

Obtención de quitosano con enzimas de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*

Obtención del extracto crudo enzimático de *C. Lindemuthianum*: El medio líquido se preparó disolviendo los siguientes ingredientes en agua destilada: 1,5% glucosa, 0,66% prolina, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O, 0,18% ZnSO₄·7H₂O, 0,1% FeSO₄·7H₂O, 0,03% MnSO₄·H₂O, 0,04% CuSO₄·5H₂O, 0,1% tiamina y 0,1% ácido nicotínico, pH 5 (Tsigos *et al.*, 1996). El hongo se cultivó en una incubadora rotacional a 150 r.p.m., 30 °C durante 5 días. El micelio y la enzima extracelular se separaron por filtración con un embudo Büchner. El sobrenadante se utilizó como fuente de enzima extracelular (Win *et al.*, 2001).

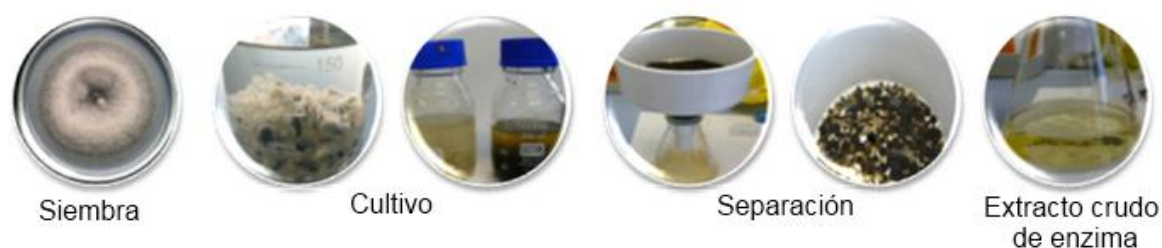


Figura 1. Extracción de enzima quitina-desacetilasa de *C. lindemuthianum*.

Obtención del extracto crudo enzimático de *M. Rouxii*: Las cepas fúngicas para la producción de la enzima se cultivaron en agar patata-dextrosa (PDA), a 30 °C durante 5 días, hasta la producción de esporas. Las esporas se recogieron en una solución estéril de Tween 80 (0,01% v/v) en agua. La suspensión de esporas (aproximadamente 10⁶ esporas/ml), se colocó en un recipiente con medio líquido estéril preparado con 0,3% de extracto de levadura, 1% de peptona y 2% de glucosa, a pH 4,5 (Bartnicki-Garcia and Nickerson 1962). El medio se incubó con agitación a 28 °C durante 48 h. Seguidamente, el micelio se separó del medio de cultivo por filtración con embudo Büchner, lavado con abundante agua destilada fría y congelado a -20 °C. Posteriormente, el micelio congelado se trituyó con Alumina A-5 (Sigma; 1:2 p/p) en un mortero a 0 °C durante 15 min. Durante la trituración se añadió gradualmente una solución

Capítulo 3. Biotransformación de quitina en quitosano mediante la utilización de enzimas procedentes de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii*

tamponada de 25 mM Tris-HCl, pH 7,2, (relación 1:7 p/v micelio húmedo: solución tamponada). El homogenizado se centrifugó a 0 °C a 4000 x g durante 10 min y posteriormente a 6000 x g durante 120 min. El sobrenadante se utilizó como extracto crudo de enzima. El extracto obtenido se utilizó directamente como fuente de la enzima en todos los experimentos.



Figura 2. Extracción de la enzima quitina-desacetilasa de *M. rouxii*.

Biotransformación de la quitina

El siguiente tratamiento se preparó disolviendo 0,1 g de quitina en 100 ml de metanol con 83% de cloruro de calcio di-hidratado (p/v) y 2% de glucosa (p/v), incorporados poco a poco, y con agitación constante durante 24 h. El solvente se eliminó por decantación y la quitina tratada químicamente se lavó con abundante agua destilada y se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 30 min (Win y Stevens, 2001). Seguidamente, la quitina (0,1 g) se suspendió en 10 ml de agua y se trató con ácido fórmico 25% (25 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. El pH de la mezcla se corrigió hasta pH 4,0 con NaOH. Esta quitina se lavó con abundante agua y se secó a 60 °C (quitina MeOH)

El último tratamiento se preparó a partir de la reacción de 30% de solución de NaOH a 100 °C durante 1 hora en una relación líquido a sólido de 10:1. El residuo sólido se lavó con abundante agua y seguidamente se secó a 50 °C (quitina NaOH) La quitina así tratada por los diversos métodos se sometió a desacetilación. Para ello 6,8 mg de quitina (peso seco) a la que se incorporó enzima quitina-desacetilasa parcialmente purificada (0,15 AU), en un volumen total de 6 ml, se mantuvieron a 50 °C en un incubador orbital (150 rpm) durante 48 horas. Posteriormente se precipitó con NaOH 1M y se lavó repetidas veces con agua destilada hasta la neutralidad.

Contenido de nitrógeno en la quitina

El contenido de nitrógeno se determinó por medio del analizador de nitrógeno LECO FP-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA).

Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

El espectro infrarrojo entre 4000 y 650 cm^{-1} se obtuvo en un equipo Perkin Elmer Spectrum 400 espectrofotómetro de infrarrojo (Perkin–Elmer Inc., Waltham, MA, USA) equipado con un accesorio ATR. Cada espectro fue el promedio de 32 barridos a una resolución de 4 cm^{-1} . El espectro base fue sustraído utilizando el software del equipo Spectrum versión 6.3.2 (Perkin-Elmer Inc.). Las medidas se realizaron a 21 ± 1 °C. Las muestras se colocaron sobre la superficie del cristal ATR y se presionaron con el punzón plano hasta que el espectro estuvo estable y con picos fácilmente diferenciables. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Determinación del grado de desacetilación

Se determinó de acuerdo al método descrito por (Moore y Roberts, 1980). Considerando la banda del –OH a 3450 cm^{-1} como referencia, el contenido de grupos acetilo (%) se determinó a partir de la relación de absorbancias: $(A_{1655} \text{ cm}^{-1}/A_{3450} \text{ cm}^{-1})100/1,33$. El grado de desacetilación se obtuvo por diferencia, considerando el 100% de acetilación en la quitina.

Determinación de la solubilidad del quitosano

Para la determinación de la solubilidad, 100 mg de quitosano se mezclaron con 5 mL de ácido láctico 0,15 M. Se agitó con ayuda de un vortex y se dejó en reposo por 24 horas. Una completa solubilidad se caracteriza por la formación de una solución transparente, el resultado es visual y se expresa como quitosano soluble (afirmación o negación).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la prueba de contrastes de Bonferroni, con el programa GraphPad Prism 5,0 (GraphPad Software, San Diego California, USA). El nivel de significación fue de $P \leq 0,05$.

Resultados y discusión

El contenido de nitrógeno de la quitina obtenida fue de $6,85 \pm 0,02\%$, lo que indica que la desproteinización enzimática fue efectiva. Estos valores son semejantes a los obtenidos por otros autores para quitina pura (6,9%) (Magnin, Lefebvre, Chornet, y Dumitriu, 2004; Synowiecki y Al-Khateeb, 2000). Tras el tratamiento químico de la quitina para que prevalezca la fracción amorfa del polímero, la enzima obtenida fue capaz de desacetilar el sustrato únicamente hasta un valor de $\sim 9\%$ (GD) después de 48 horas de reacción ($p < 0,05$) (Tabla 1). Además, en ninguno de los tres tratamientos se observó quitina soluble, lo que corrobora la pobre calidad de la quitina obtenida. Durante el proceso no se pudo establecer claramente qué microorganismo produce una enzima más eficiente ya que presentan distintas propiedades bioquímicas en función a la fuente de obtención, tal como se ha descrito en la bibliografía (Zhao, Park, y Muzzarelli, 2010). Cai *et al.*, (2006); y Tsigos y Bouriotis, (1995) obtienen resultados similares (3% GD) al desacetilar quitina cristalina. Estos autores consiguen una mejora en el proceso a partir de sustratos hidrosolubles de quitosano o sustratos amorfos previamente tratados. En el caso de quitina pretratada con ácido sulfúrico frío (15 ml, 98% p/p) o glicol (Cai *et al.*, 2006; Tsigos y Bouriotis, 1995; Win y Stevens, 2001) se obtiene un grado de desacetilación semejante a los del presente trabajo (0,5-10% GD). En este contexto, se ha documentado que la enzima requiere por lo menos cuatro residuos de N-acetilglucosamina para catalizar el proceso de desacetilación, si bien son necesarios estudios en profundidad para determinar los requerimientos de la enzima para reconocer al sustrato cristalino y su mecanismo de acción (Kafetzopoulos, Martinou, y Bouriotis, 1993).

Tabla 1. Contenido de nitrógeno (%N) y grado de desacetilación (GD, %) alcanzado a través de la desacetilación enzimática de quitina.

Sustrato	pH	Fuente enzimática	GD (%)	Soluble
Quitina cristalina	4,5	<i>M. rouxii</i>	0,10 + 0,07a	X
	7,3	<i>C. lindemuthianum</i>	0,22 + 0,14a	X
Quitina HCl	4,5	<i>M. rouxii</i>	3,79 + 1,15b	X
	7,3	<i>C. lindemuthianum</i>	7,91 + 0,65c	X
Quitina MeOH	4,5	<i>M. rouxii</i>	8,85 + 1,49d	X
	7,3	<i>C. lindemuthianum</i>	5,26 + 1,08b,c	X
Quitina 30% NaOH	4,5	<i>M. rouxii</i>	75,49 + 0,63e	√
	7,3	<i>C. lindemuthianum</i>	88,38 + 0,17f	√

Letras diferentes (a,b,c,d,e,f) indican diferencias significativas entre las muestras.

Capítulo 3. Biotransformación de quitina en quitosano mediante la utilización de enzimas procedentes de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor roxii*

El mayor grado de desacetilación se alcanzó después de utilizar una solución 30% (p/v) de NaOH (7,5 M) durante 2 horas a 100 °C. El tratamiento de desacetilación más adecuado resulto ser el que genera más residuos químicos, con el consiguiente problema medioambiental que supone la eliminación final de este tipo de residuos (Tabla 1). Además, la quitina previamente tratada con NaOH fue mucho más soluble. El grado de desacetilación de la quitina obtenida con un tratamiento del 30% de NaOH (p/v) sin desacetilación enzimática mediante enzimas fúngicas fue del 68%, lo que evidencia que las enzimas fúngicas no fueron eficientes para desacetilar la quitina. El proceso dio como resultado una quitina y un quitosano con inconsistentes propiedades físicas, hecho que se ha referido con anterioridad (Brine y Austin, 1981; Oh, Shih, Tzeng, y Wang, 2000). Otros autores documentan la infructífera desacetilación enzimática de los sustratos de quitina (Win y Stevens, 2001) debido a que la alta cristalinidad e insolubilidad de la quitina representan dos barreras importantes durante el curso de la reacción enzimática (Beaney, Gan, Magee, Healy, y Lizardi-Mendoza, 2007). Ambos parámetros afectan la accesibilidad al sustrato, lo que impide que la enzima actúe en el interior del grupo aceto, influyendo negativamente en la obtención de quitosanos con alto grado de desacetilación (Fig. 3). El pre-tratamiento en estos casos es necesario para incrementar la interacción entre la enzima desacetilasa y la quitina.

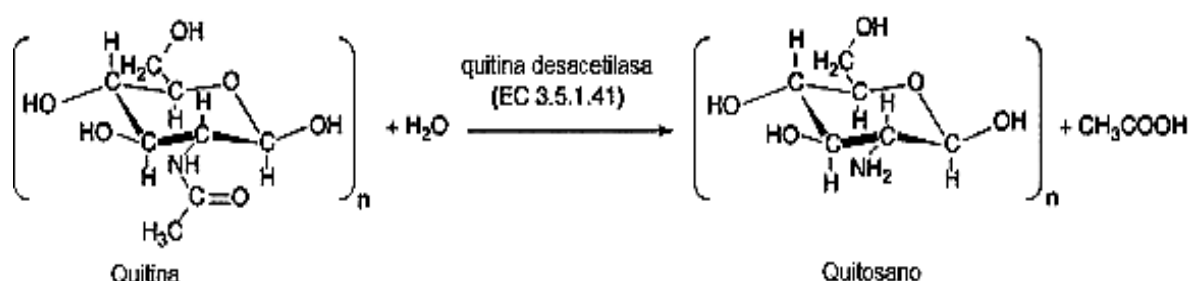


Figura 3. Acción catalítica de la quitina desacetilasa; la quitina es desacetilada por la enzima para formar quitosano y acetato (Tsigos, Martinou, Kafetzopoulos, y Bouriotis, 2000).

A partir de los espectros infrarrojo de las muestras, se consideraron ocho bandas de referencia ($3430, 2920, 2880, 1425, 1155, 1070, 1030$ y 895 cm^{-1}) para evaluar el efecto de la enzima sobre el sustrato, tal y como indica Dong *et al.*, (2001). De acuerdo al grado de desacetilación obtenido, estas bandas aparecen desplazadas hacia una longitud de onda mayor o menor. Las bandas situadas a $\sim 3430\text{ cm}^{-1}$ (estrechamiento O-H) y $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ (estrechamiento C-O)

aparecen a menores longitudes de onda según disminuye el grado de desacetilación. Por otro lado, las bandas a $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ (estrechamiento asimétrico del CH_2 y simétrico del CH_3) y $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$ (estrechamiento asimétrico del enlace del oxígeno) aparecen a mayores longitudes de onda según disminuye el grado de desacetilación, tal y como observan Dong *et al.*, (2001). Estos efectos se evidenciaron en las muestras de quitina tratadas con las enzimas fúngicas quitina-desacetilasa, extraídas del *C. lindemuthianum* y *M. rouxii* (Fig. 4 A y B). En el espectro de quitina parcialmente desacetilada con enzima obtenida a partir de *C. lindemuthianum* (Fig. 4C), aparece un pico correspondiente a la destrucción del enlace $\text{C}=\text{N}---\text{H}-\text{N}$ a causa de la desacetilación a través de la separación de grupos acetilo, dejando únicamente los grupos amino unidos a la cadena del polisacárido (Pearson, Marchessault, y Liang, 1960). La banda situada a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ aparece de forma muy intensa en quitosanos con un grado de desacetilación mayor al 50%, y la banda a $\sim 1115\text{ cm}^{-1}$ solo aparece en quitosanos con GD menores al 50% (Dong *et al.*, 2001). En la Figura 4A y 4B se observa únicamente esta última banda, que representa el estrechamiento asimétrico en el plano del anillo, y que se situó a 1115 cm^{-1} en la quitina desacetilada con enzima extraída de *C. lindemuthianum* y a 1111 cm^{-1} en los quitosanos obtenidos con enzima extraída de *M. rouxii*. Estas bandas no aparece en los quitosanos tratados químicamente con una solución al 30% (p/v) de NaOH (Fig. 4C). Algunos autores indican que si bien la cristalinidad en polisacáridos como la quitina se atribuye al gran número de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, carbonilo, amino y amida de las cadenas vecinas (Petrov, Lymperakis, Friák, y Neugebauer, 2013), el NaOH accede fácilmente a la cadena polimérica, por lo cual este proceso es más eficiente conforme se incrementa la concentración de NaOH y la temperatura, ya que la cristalinidad de la quitina disminuye (Yaghobi y Mirzadeh, 2004).

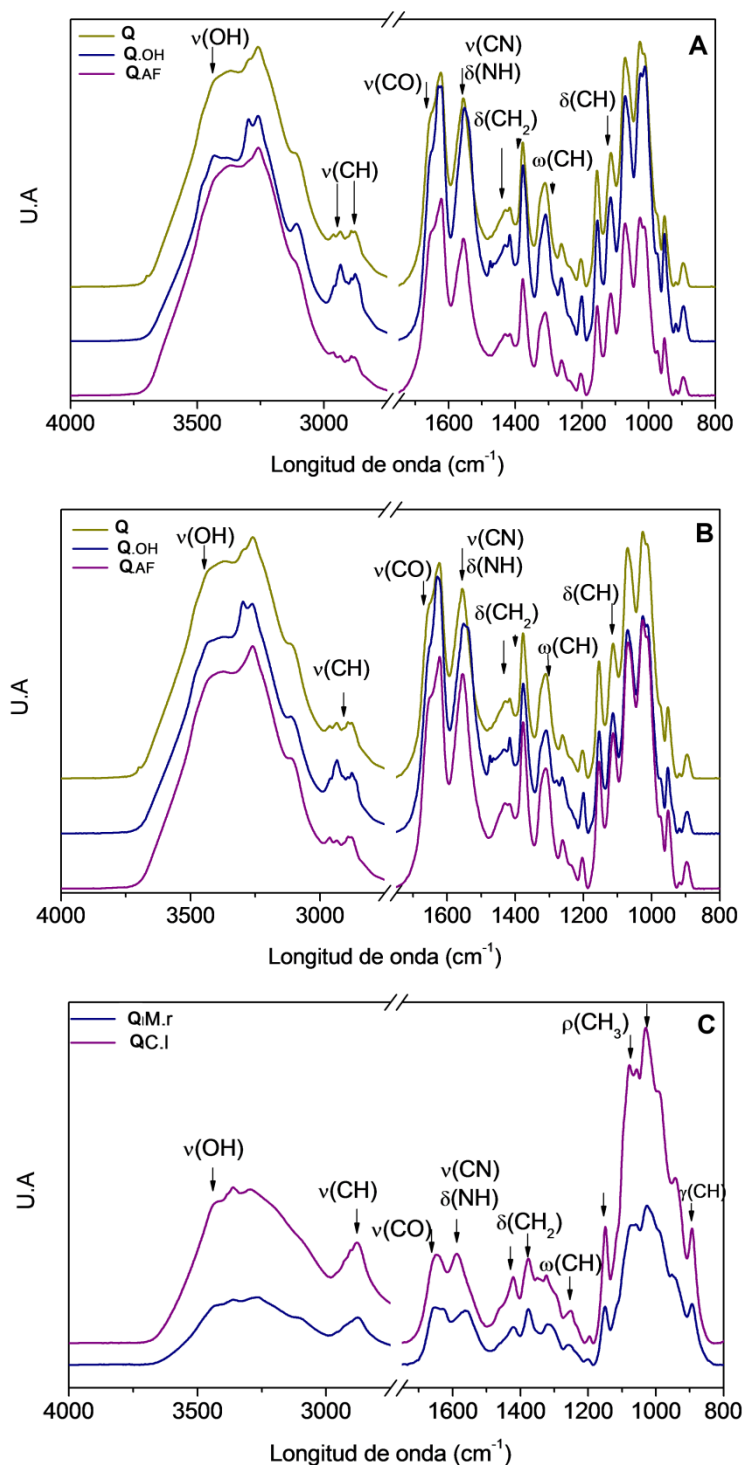


Figura 4. Espectro infrarrojo de quitina (Q) pretratada con metanol (OH), o ácido fórmico (AF), parcialmente desacetilada utilizando A) enzima extraída de *C. lindemuthianum* (C.I.), B) *M. roxii* (M.r), C) con NaOH 30% (p/v) y extracto enzimático de C.I y M.r.

Conclusiones

Las modificaciones realizadas a la quitina para incrementar la accesibilidad de la quitina desacetilasa procedentes de extractos crudos enzimáticos de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor rouxii* no fueron suficientes para obtener un quitosano con alto grado de desacetilación. Los mejores resultados se obtuvieron después de tratar la quitina con una solución de NaOH al 30% (p/v), que incrementó alrededor de veinte veces la actividad de la enzima sobre el sustrato. Es necesario establecer pretratamientos más efectivos que permitan llevar a cabo una bioconversión de la quitina con la consiguiente obtención de quitosanos con el grado de desacetilación deseado y respetuoso del medio ambiente.

Bibliografía

- Abdou, E., Nagy, K., & Elsabee, M. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367.
- Araki, Y., & Ito, E. (1975). A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii*. *European Journal of Biochemistry*, 55(1), 71-78.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Carmen Gómez-Guillén, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., & Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80.
- Beaney, P. D., Gan, Q., Magee, T. R. A., Healy, M., & Lizardi-Mendoza, J. (2007). Modification of chitin properties for enzymatic deacetylation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(2), 165-173.
- Brine, C. J., & Austin, P. R. (1981). Chitin variability with species and method of preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 69(2), 283-286.
- Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., & Kennedy, J. F. (2006). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 211-217.
- Cohen, E. (2010). Chapter 2 - Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition. In C. Jérôme & J. S. Stephen (Eds.), *Advances in Insect Physiology* (Vol. Volume 38, pp. 5-74): Academic Press.
- Chebotok, E. N., Novikov, V. Y., & Konovalova, I. N. (2006). Depolymerization of chitin and chitosan in the course of base deacetylation. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 79(7), 1162-1166.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981-1014.
- Dong, Y., Xu, C., Wang, J., Wang, M., Wu, Y., & Ruan, Y. (2001). Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China Series B: Chemistry*, 44(2), 216-224.
- Gao, X. D., Katsumoto, T., & Onodera, K. (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J Biochem*, 117(2), 257-263.

Capítulo 3. Biotransformación de quitina en quitosano mediante la utilización de enzimas procedentes de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Mucor roxii*

- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A., & Bouriotis, V. (1993). Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 2564-2568.
- Kauss, H., Jeblick, W., & Young, D. H. (1983). Chitin Deacetylase from the Plant Pathogen *Colletotrichum Lindemuthianum*. *Plant Science Letters*, 28, 231-236.
- Magnin, D., Lefebvre, J., Chornet, E., & Dumitriu, S. (2004). Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*, 55(4), 437-453.
- Martinou, A., Bouriotis, V., Stokke, B., & Vårum, K. (1998). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans. *Carbohydrate Research*, 311(1-2), 71-78.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (1995). Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate research*, 273(2), 235-242.
- Moore, G. K., & Roberts, G. A. F. (1980). Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(2), 115-116.
- Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M., & Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 521-526.
- Oh, Y.-S., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., & Wang, S.-L. (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 3-10.
- Pearson, F. G., Marchessault, R. H., & Liang, C. Y. (1960). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. *Journal of Polymer Science*, 43(141), 101-116.
- Petrov, M., Lymperakis, L., Friák, M., & Neugebauer, J. (2013). Ab Initio Based conformational study of the crystalline α -chitin. *Biopolymers*, 99(1), 22-34.
- Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18(3), 117-131.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68(2), 147-152.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K., & Mori, Y. (1997). Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydrate Research*, 303(3), 353-358.
- Tsaih, M., & Chen, R. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of applied polymer science*, 88(13), 2917-2923.
- Tsigos, I., & Bouriotis, V. (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem*, 270(44), 26286-26291.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 18(7), 305-312.
- Win, N., & Stevens, W. (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 334-341.
- Yaghobi, N., & Mirzadeh, H. (2004). Enhancement of Chitin's Degree of Deacetylation by Multistage Alkali Treatments. *Iranian Polymer Journal*, 131-136.
- Zhao, Y., Park, R.-D., & Muzzarelli, R. A. A. (2010). Chitin Deacetylases: Properties and Applications. *Marine drugs*, 8(1), 24-46.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

Resumen

En el presente trabajo se desarrollaron películas activas en base a quitosano obtenido a través de un proceso químico suave, utilizando un 10% NaOH durante la desacetilación, y un concentrado proteico (PCc) obtenido a partir de residuos de langostino. La adición de PCc influyó en gran medida sobre las propiedades fisicoquímicas, dando lugar a películas con más elásticas, más fuertes y menos deformables. La presencia de PCc mejoró las propiedades de barrera a la luz y estas Las películas de quitosano mostraron buenas propiedades antioxidantes y antimicrobianas, que se incrementaron por la incorporación de PCc. La importancia de estas películas radica en el hecho de que las proteínas generalmente no mejoran las propiedades antimicrobianas, por lo que son especialmente útiles para aplicaciones alimentarias.

Palabras clave: *residuos de langostino, aislamiento suave de quitosano, concentrado proteico, película comestible, antioxidante, antimicrobiana.*

Introducción

En la actualidad, la incorporación de agentes antimicrobianos y antioxidantes en películas comestibles es uno de los avances más destacados en tecnología de los alimentos. La necesidad de nuevos envases antimicrobianos con baja o limitada migración de sustancias activas al alimento continúa siendo objeto de estudio, ya que evitar el deterioro de los alimentos, aumentar su vida útil y garantizar su seguridad es de gran importancia. Desde el punto de vista ambiental es deseable que al menos el envase sea biodegradable y en lo posible procedente de fuentes sostenibles de bajo coste (Conte, Angiolillo, Mastromatteo y Nobile, 2013).

En este contexto, los residuos de langostino son una fuente valiosa de quitina, proteínas y carotenoides, sustancias bioactivas de gran demanda por parte de las industrias alimentarias y farmacéuticas (Mezzomo, Maestri, dos Santos, Maraschin y Ferreira, 2011; Pérez-Santín, Calvo, López-Caballero, Montero y Gómez-Guillén, 2013; Rødde, Einbu y Vårum, 2008). El quitosano se obtiene por N-desacetilación de la quitina, y el proceso de aislamiento básicamente consiste en una desproteínización y una desmineralización (Gildberg y Stenberg, 2001). El proceso de obtención ha sido ampliamente estudiado y parámetros como el peso molecular y el grado de N-acetilación son de especial importancia, además de la influencia del proceso y las condiciones bajo las cuales este polímero se recupera que determinarán las propiedades

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

físicas, químicas y biológicas finales (Kumirska, Weinhold, Thöming y Stepnowski, 2011). Los métodos tradicionales generalmente involucran un importante consumo de reactivos y por lo tanto no son técnicamente respetuosos con el medio ambiente. Además estos métodos no son muy eficaces a la hora de recuperar la proteína presente en los exoesqueletos (Peña Valdez *et al.*, 2010).

Actualmente el quitosano despierta gran interés debido a sus propiedades antimicrobianas, biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad formadora de películas (Devlieghere, Vermeulen y Debevere, 2004). La mayoría de los estudios de envases de quitosano se han centrado en mejorar las propiedades activas (Feng, Du, Li, Hu y Kennedy, 2008; Yu *et al.*, 2013). Por otro lado, los aislados proteicos y carotenoides se conocen por poseer una gran actividad antioxidante (Manni, Ghorbel-Bellaaj, Jellouli, Younes y Nasri, 2010; Pérez-Santín, Calvo, López-Caballero, Montero y Gómez-Guillén, 2013; Sowmya, Rathinaraj y Sachindra, 2011). En este sentido, Arancibia, Alemán, Calvo, López Caballero, Montero y Gómez-Guillén, (2014) encontraron actividad antimicrobiana y antioxidante en hidrolizados de caroteno-proteínas recuperados de los residuos del procesamiento del langostino (cabezas y exoesqueleto). Además, se han identificado proteínas multifuncionales que contienen subdominios antimicrobianos en algunos grupos de crustáceos; algunas de estas proteínas se han caracterizado *in vivo* como parte del sistema inmunológico de los animales (Rosa y Barracco, 2010). Los concentrados proteicos y el quitosano son subproductos de la industria de crustáceos y muestran un excelente potencial como ingredientes activos en el desarrollo de películas comestibles.

Por lo tanto, se está prestando mucha atención a la mejora de la estabilidad y funcionalidad de los complejos proteína-polisacáridos de los crustáceos para el desarrollo de productos (Romero, Verwijlen, Guerrero y Vermant, 2013). En esa línea, la adición de un extracto rico en proteínas y lípidos a un recubrimiento de quitosano muestra un futuro prometedor confiriendo propiedades activas (Arancibia *et al.*, 2014), que podría ser viable en el desarrollo de películas comestibles.

Los objetivos de esta investigación fueron recuperar diferentes materiales a partir de los residuos del procesamiento industrial (cefalotórax y exoesqueleto) de langostino (*Litopenaeus vannamei*) y evaluar su potencial aplicación para el desarrollo de películas comestibles activas.

Materiales y métodos

Recuperación de material precursor de la película

El extracto lipoproteico se preparó a partir de langostinos congelados (*Litopenaeus vannamei*), proporcionados por Angulas Aguinaga Burgos (Burgos, España). Los residuos de langostino (cefalotórax y exoesqueleto) se suspendieron en agua (relación 1:1 p/v) y se sometieron a una autólisis con incubación a 40 °C durante 4 horas con agitación constante. Después de la inactivación térmica (80 °C durante 20 min), la suspensión con los residuos autolisados se conservó a 2 °C durante la noche. A continuación se separó el residuo sólido (consistente en material quitinoso), por filtración a través de un lienzo fino. La fase acuosa se centrifugó (10000 x g, 30 min, 5 °C), se descartó el sobrenadante y el sedimento se liofilizó. Este sólido seco liofilizado constituye el extracto lipoproteico *PCC*. La composición proximal de este concentrado fue 42,3% de proteína, 11,48% de lípidos y 29,38% de minerales (Arancibia *et al.*, 2014).

El quitosano se obtuvo a partir del material quitinoso recuperado en la etapa anterior, siguiendo una desmineralización con ácido láctico (75,6 g/L), en una proporción 1:3 (p/v) durante 36 horas a 21 °C. El sólido fue recuperado y la proteína eliminada a través de una hidrólisis enzimática con Viscozyme® L (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) (pH 4,5; 50 °C) seguido por una hidrólisis con Alcalasa® (Sigma-Aldrich Química, S.L. España) 2,4 L (pH 8,5; 50 °C), utilizando un pH-estato (TIM 856, radiómetro analítico, Villeurbanne Cedex). La inactivación enzimática se llevó a cabo a 90 °C durante 10 min. La eliminación de los grupos acetilo de la quitina se realizó mediante una solución de NaOH al 10%, proporción 1:7 (p/v) durante 72 h a 100 °C con agitación constante. El quitosano resultante *Ch* se lavó con agua destilada hasta alcanzar la neutralidad.

Caracterización del quitosano

El peso molecular viscosimétrico ($M_{w,v}$) del quitosano se determinó mediante viscosimetría capilar utilizando un viscosímetro Cannon-Fenske (Cannon Instruments Co., Estados Unidos; tamaño 50) a partir de la viscosidad intrínseca experimental $[\eta]$ (mL/g) del quitosano disuelto en una solución de ácido acético 0,1 M y solución de cloruro de sodio 0,2 M. Las medidas se realizaron a 25 °C utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada-Staudinger: $[\eta] = K_m M^\alpha$, donde $K_m = 1,81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}$ y $\alpha = 0,93$ (Roberts y Domszy, 1982). Para el cálculo se realizó el promedio de cuatro repeticiones.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

El grado de desacetilación (GD) se determinó por el método de (Miya, Iwamoto, Yoshikawa y Mima, 1980), teniendo en cuenta como referencia la banda —OH a 3450 cm^{-1} . El contenido de grupos acetilo se determinó a partir de la relación de absorbancias: $(A_{1655}\text{ cm}^{-1}/A_{3450}\text{ cm}^{-1}) \times 100/1,33$ (Domard y Rinaudo, 1983).

Preparación de las películas

La solución de quitosano y la solución del extracto lipoproteico de partida se prepararon por separado. El quitosano se disolvió (2% p/p) en una solución de ácido láctico 0,15 M (pH 3,2). El extracto lipoproteico, recuperado a partir de los residuos de langostinos, se dispersó (1% p/p) en una solución de ácido láctico de 0,15 M. Ambas soluciones se pasaron por un sonicador (Q700, Qsonica, CT, EEUU) durante 1 min al 100% de amplitud. La solución formadora de la película de quitosano se preparó mediante la combinación de la solución de partida de quitosano con la solución de ácido láctico en proporción 1:1 (la concentración final del quitosano fue de 1% p/p). La solución formadora de la película de quitosano con el extracto se preparó en relación 1:1 de cada solución, hasta una concentración final de 1% (p/p) de quitosano (Ch) y 0,5% (p/p) de extracto de lipoproteico (PCc).

La viscosidad de las soluciones formadoras de película se determinó a $25 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando un reómetro Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido) con geometría de cono-plato (ángulo de cono de 4° , abertura 0,15 mm), a una velocidad de cizalla constante de $0,5\text{ s}^{-1}$. Los resultados fueron el promedio de cinco determinaciones y se expresaron como mPa.s.

Las películas se prepararon con 25 g de cada solución formadora de película en placas de metacrilato ($120 \times 120\text{ mm}$) (Plexiglas[®] GS Röhm GmbH y Co KG, Darmstadt, Alemania). Las placas se secaron en una estufa (FD 240 Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 12 horas a $45 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las películas se acondicionaron a $58,0 \pm 0,2\%$ humedad relativa (HR) durante 4 días antes de los análisis. Las muestras se denominaron **Ch-F**: películas de quitosano y **ChPCc-F**: películas de quitosano con el extracto lipoproteico.

Caracterización de las películas

Espesor

El espesor se midió con un micrómetro (MDC-25M, Mitutoyo, Kanagawa, Japón) en 4 a 6 lugares al azar en 15 películas como mínimo para cada tratamiento.

Microestructura

La estructura de las películas (Ch10-F y Ch10PCc-F) se observó mediante tres métodos ópticos: las imágenes de la superficie se obtuvieron con un Estereomicroscopio (estereomicroscopio Zoom L2S8 APO, Leica Microsystems, Suiza), un microscopio óptico Nikon (AFX-IIA, equipado con una cámara Nikon mod. FX35W Nikon Corporation, Japón) y microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (*cryo*-SEM) (Oxford CT1500 Cryosample unidad de preparación, Oxford Instruments, Oxford, Inglaterra). Esta última técnica fue utilizada para examinar la sección transversal representativa de las películas; las muestras se montaron con la técnica de tomografía de coherencia óptica (OCT compuesto Gurr®), fijadas mecánicamente sobre el contenedor y crio-fracturadas tras el montaje según lo descrito por Gómez-Guillén, Bifani, Silva y Montero (2007).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis calorimétrico de las películas se realizó utilizando un calorímetro diferencial (DSC) modelo TA-Q1000 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos) previamente calibrado con indio de alta pureza (punto de fusión, °C 156,4; entalpía de fusión, 28,44 J/g). Las muestras (10-15 mg \pm 0,002 mg de película, aproximadamente) se pesaron en una balanza electrónica (modelo ME235S Sartorius, Goettingen, Alemania) y después se encapsularon en recipientes herméticos de aluminio. Una cápsula vacía se utilizó como referencia. Las muestras se analizaron bajo atmósfera de nitrógeno seco (50 mL/min), entre 5 y 400 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura máxima (T_{pico} , °C) y la entalpía de desnaturalización (ΔH) se determinaron al menos por triplicado. Los datos se normalizaron al contenido de materia seca (J/g_{MS}) después de la desecación de cada cápsula. Las muestras se secaron en sílice antes de los análisis.

Espectroscopia de infrarrojo FTIR-ATR

Los espectros de infrarrojo de las películas se registraron, entre 4000 y 650 cm^{-1} , con un espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer espectro 400 (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA) equipado con un accesorio de cristal prisma ATR. Cada espectro es el promedio de 32 interferogramas y la resolución espectral fue 4 cm^{-1} . El fondo se restó utilizando el software Spectrum versión 6.3.2 (Perkin-Elmer Inc.). Las medidas se realizaron a 21 ± 1 °C. Las películas comestibles se colocaron en la superficie del cristal ATR y se presionaron con un émbolo de punta plana hasta obtener espectros con picos bien definidos y estables. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado. Para la sustracción del fondo y la obtención de la segunda

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

derivada de la amida I y amida II se utilizó el software Spectrum versión 6.3.2 (Perkin-Elmer Inc.).

Propiedades mecánicas

Las pruebas de resistencia y de punción se realizaron con un analizador de textura TA.XT2 plus (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) controlado por el *Software Texture Exponent* (Texture Technologies and by Stable Micro Systems, Ltd., Scarsdale, NY, USA). Las películas se cortaron en rectángulos (100 mm × 20 mm) según el método descrito por Blanco-Pascual, Martín Fernández y Montero, (2013). La resistencia (TS , MPa) y elongación en la rotura (EAB , %), se determinaron a partir de las curvas obtenidas al representar la tensión vs la deformación en el punto de rotura, y el módulo elástico o módulo de Young (Y , MPa) se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva.

La prueba de punción se realizó con películas de 100 × 100 mm fijadas en una celda de 35 mm de diámetro hasta el punto de rotura, utilizando un émbolo redondeado (5 mm) de acero inoxidable a una velocidad de 100 mm/min. La fuerza de rotura (F , N) y el punto de rotura (D , %), se determinaron según Sobral, Menegalli, Hubinger y Roques (2001). El ensayo se llevó a cabo al menos por triplicado a temperatura ambiente y manteniendo las muestras al 58% de humedad relativa hasta el inicio del ensayo.

Propiedades de barrera de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó, al menos por triplicado, siguiendo el método descrito por Sobral *et al.*, (2001) a 21 ± 1 °C en un desecador con agua destilada (100% RH). Las muestras se pesaron cada hora, al menos durante 7 h. La permeabilidad al vapor de agua se calculó siguiendo la ecuación: $w \cdot x \cdot t^{-1} \cdot A^{-1} \cdot \Delta P^{-1}$, donde w es el peso ganado (g), x es el espesor de la película (mm), t es el tiempo (h), A es el área de película expuesta (cm²) y ΔP es la diferencia de presión parcial de vapor entre la atmósfera y el gel de sílice (2642 Pa a 22 °C). Los resultados se expresaron en g mm h⁻¹ cm⁻² PA⁻¹.

El contenido de humedad de cada muestra acondicionada se determinó por diferencia de peso al secar las muestras, alrededor de 0,5 g, a 105 °C durante 24 h, según la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C, 1995). El ensayo se realizó al menos por triplicado. El contenido en agua se expresó como porcentaje del peso total.

La actividad de agua se determinó mediante un equipo lab -MASTER-aw (Novasina AG, Lachen, Suiza). Las muestras se cortaron exactamente con la misma área base de los contenedores del

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

equipo para que la película quedara fija en la parte inferior del contenedor. Los ensayos se realizaron por triplicado y a temperatura constante de 25 °C.

Para la prueba de solubilidad en agua, las películas comestibles se cortaron en forma de círculo de 40 mm de diámetro y se colocaron en recipientes de plástico con 50 mL de agua destilada, a 22 °C durante 24 h. La solución resultante se filtró a través de papel filtro Whatman # 1 para recuperar el residuo de la película sin disolver, que seguidamente se desecó a 105 °C durante 24 h. La solubilidad película FS (%) se calculó mediante la expresión $[(W_o - W_f) / W_o] \times 100$, donde W_o es el peso inicial de la película expresada como materia seca y W_f es el peso del residuo desecado sin disolver de la película. El análisis se llevó a cabo al menos por triplicado.

La resistencia al agua se determinó siguiendo el método descrito por Blanco Pascual *et al.*, (2013). Las películas se fijaron a células calibradas (área 15,90 cm²) y después se colocaron en desecadores con agua destilada (100%HR). A continuación se vertió agua destilada (5 mL) sobre la superficie de la película y se registró la deformación de la película debido al efecto del agua (cm), el tiempo en que el agua comienza a filtrarse a través de la película y el tiempo que tarda la película en romperse. Todas las pruebas se llevaron a cabo al menos por triplicado.

Color, absorción de la luz, y transparencia

Los parámetros de color, L^* (luminosidad), a^* (rojo/verde) y b^* (amarillo/azul) se midieron con un colorímetro Konica Minolta CM - 3500 d (Konica Minolta, Madrid, España), un iluminador D65 (luz natural) y observador estándar D10. Las medidas se realizaron en 5 zonas diferentes de la película y cada valor fue el promedio de las medidas al menos de 15 películas. Las propiedades de barrera a la luz se determinaron utilizando un espectrofotómetro UV-1601 (modelo CPS-240, Shimadzu, Kyoto Japón) a las longitudes de onda de 200 a 800 nm. Las películas se cortaron con forma rectangular y se colocaron directamente en la celda de prueba del espectrofotómetro, utilizando una celda vacía como referencia. La transparencia (%T) se calculó siguiendo el método descrito por Ifuku *et al.*, (2007). Los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

Actividad antioxidante de las películas

La capacidad de captación del radical ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino- 6-sulfónico)] y FRAP (capacidad reductora del hierro) se utilizaron para medir la actividad antioxidante de las películas (Ch10-F, Ch10PCc-F). Ambas películas se disolvieron en agua destilada y se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea. Las soluciones de la película se filtraron a través de papel Whatman N° 1. El método utilizado para los ensayos de FRAP y ABTS

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

fue el descrito previamente por Alemán, Giménez, Montero y Gómez-Guillén, (2011). Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles Fe}^{2+}$ equivalentes/g para FRAP y mg de capacidad de antioxidante equivalente de vitamina C (VCEAC) /g para ABTS, basados en curvas estándar de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y vitamina C, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante espectrofotometría con el reactivo de Folin Ciocalteau, por triplicado, usando como estándar ácido gálico según modificación al método de Slinkard y Singleton, (1977). Una alícuota de 10 μl de la muestra se mezcló con 750 μl de agua destilada y oxidada con 50 μl de reactivo de Folin Ciocalteau. La reacción se neutralizó con 150 μl de solución de carbonato sódico y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución resultante (coloración azul) se midió a 765 nm (UV-1601, modelo CPS-240, Shimadzu, Kioto, Japón). Los resultados se expresaron como equivalente de ácido gálico (GA) mg/g de muestra. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas comestibles se determinó por el método de difusión en disco en placa de agar como se describió anteriormente (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén y Montero, 2010). Las películas comestibles se recortaron en discos de 30 mm de diámetro y se dispusieron sobre la superficie del agar previamente inoculada. Los microorganismos seleccionados por su importancia en la salud (como probióticos o patógenos) o por ser responsables del deterioro de pescado, se obtuvieron de la colección cultura español tipo (CECT): *Escherichia coli* CECT 515, *Lactobacillus acidophilus* CETC 903, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Photobacterium fosfóreo* CECT 4192, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Salmonella cholerasuis* CECT 4300, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Staphylococcus aureus* CECT 240. Después de la incubación, el diámetro de inhibición (considerado la actividad antimicrobiana) se midió con el software Corel Photo Paint X3. Los resultados se expresaron como inhibición del crecimiento (mm). Cada determinación se realizó por duplicado.

Además del diámetro de inhibición, también se estableció la actividad antimicrobiana circunscrita al área ocupada por la película en contacto con la placa de agar previamente inoculada. Así, después de la incubación, 1 g de la superficie del agar en contacto con la película comestible se recogió cuidadosamente y se colocó en un tubo estéril con 9 ml de agua de peptona tamponada (0,1 g/100 ml de agua) y se agitó durante 1 min dentro de un cabina de

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

flujo laminar vertical (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, España). A continuación se prepararon diluciones apropiadas, se sembraron en superficie y se incubaron a la temperatura deseada. El recuento final se llevó a cabo después de 48 horas. Cada determinación se realizó por duplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) para el análisis de varianza ANOVA de una vía. La comparación por pares se llevó a cabo mediante la prueba de Bonferroni, con un nivel de significación de $P \leq 0,05$.

Resultados

Propiedades del quitosano

El quitosano obtenido a través de un proceso químico suave tuvo un grado de desacetilación (DD) de 74% y un peso molecular (Mw) de ~ 320 kDa, similar a los valores descritos en la literatura para quitosano desacetilado usando NaOH altamente concentrada (Gupta y Jabrail, 2006; Khan, Peh y Moder, 2002; Nemtsev, Gamzazade, Rogozin, Bykova y Bykov, 2002; Ravi Kumar, 2000; Zhang, Xue, Li, Zhang y Fu, 2006). Tradicionalmente, la preparación de quitosano implica la desproteinización y desmineralización con ácidos y bases fuertes. Sin embargo, el uso de estos productos químicos puede causar una desacetilación parcial de la quitina y la hidrólisis del polímero, dando lugar a propiedades químicas que son difíciles de controlar (Salt y Austin, 1981). Sin embargo, con el método suave propuesto en el presente trabajo, fue posible obtener quitosano con propiedades funcionales adecuadas. En primer lugar, en vez de una desproteinización química (Khan, Peh y Ch'ng, 2002; Nemtsev, Gamzazade, Rogozin, Bykova y Bykov, 2002; Ravi Kumar, 2000), se siguió un proceso enzimático utilizando Viscozyme y alcalasa, que dio como resultado un hidrolizado proteico (40 g/100 g de material quitinoso b.s). Otros autores han utilizado métodos enzimáticos con enzimas proteolíticas, como alcalasa, para recuperar la quitina, y un hidrolizado proteico nutricional (17,8% y 40,6% b.s respectivamente) a partir de los residuos del tratamiento del langostino, (Synowiecki y Al-Jatib, 2000). En el presente trabajo, la acción combinada de Viscozyme y Alcalasa, permitió alcanzar una eficaz desproteinización de la quitina probablemente debido a que la Viscozyme es un complejo multi-enzimático que favorece la extracción. Además, no hay ninguna referencia sobre el uso de Viscozyme como agente de desproteinización de la quitina. La

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

extracción de quitosano comúnmente se consigue utilizando concentraciones elevadas (alrededor del 50%) de NaOH durante el proceso de desacetilación (Hwang *et al.*, 2002; Yuan, Chesnutt, Haggard y Bumgardner, 2011). En el presente estudio, solo un 10% NaOH (p/v) fue suficiente para alcanzar un grado de desacetilación adecuado y con ello una quitina ligeramente depolimerizada y un quitosano altamente soluble en medio ácido mediante un proceso ecológico, probablemente debido a la eficacia de la desproteínización enzimática.

Soluciones filmogénicas

La viscosidad de la solución filmogénica de quitosano solo ($5,82 \pm \text{Pa.s}$) fue dos veces superior que la de la solución filmogénica en la que se incorporó el extracto lipoproteico PCc ($\pm 2,68 \text{ Pa.s}$). De hecho, esta última solución filmogénica realmente fue una suspensión con partículas pequeñas en su interior. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares controlan la conformación y por lo tanto la viscosidad del quitosano en solución (Argüelles-Monal, Goycoolea, Peniche y Higuera-Ciapara, 1998). Probablemente la adición de PCc interrumpe la red quitosano, rompiendo la unión de hidrógeno y provocando así a una disminución en la viscosidad. Por otra parte, la presencia de lípidos en PCc podrían actuar como un agente tensoactivo, hecho que explicaría la disminución de la viscosidad del sistema según lo sugerido por Nyström, Kjøniksen y Iversen (1999). Con el fin de aumentar la solubilidad de quitosano y evitar la formación de un complejo proteína-quitosano, el pH se ajustó a 3,2 con ácido láctico 0,15 M para asegurar que ambos polímeros estuvieran cargados positivamente. Ferreira, Nunes, Delgadillo y Lopes-da-Silva (2009) observaron que concentraciones altas de proteína pueden obstaculizar la solubilización del quitosano.

Propiedades de las películas

Aspectos morfológicos

El espesor de las películas de quitosano fue de $34 \pm 6,30 \mu\text{m}$. La incorporación de PCc aumentó el espesor de la película a $148 \pm 42,5 \mu\text{m}$. Las microfotografías de la superficie tomadas en el estéreomicroscopio se muestran en la Figura 1 (a y b). Las partículas de PCc de diferentes tamaños y formas aparecen distribuidas como inclusiones en la matriz homogénea de quitosano, tal como describió Alvarado *et al.*, (2007). La Figura 1 (c y d) muestra imágenes de microscopía óptica de la superficie de la película. La película Ch10-F tiene un aspecto suave y uniforme con las fibras de quitosano claramente distinguibles, como también observó Kweon, Ha, Um y Park (2001), mientras que en la Ch10PCc-F se apreció un gran número de inclusiones.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

El tamaño y la cantidad de inclusiones parecen influir en el espesor y la mayoría de las propiedades físicas. Las imágenes de *cryo*-SEM de las secciones transversales (Fig. 1e y f) mostraron diferencias en la morfología de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F. La película Ch10-F exhibe una estructura compacta, homogénea y cohesiva, sin poros (Fig. 1e), mientras que la película Ch10PCc-F posee una matriz más amorfa con numerosas inclusiones de PCc (Fig. 1f). Las imágenes de *cryo*-SEM de la superficie de la película (Fig. 1g y h) muestran una estructura continua en Ch10-F y las inclusiones del concentrado proteico en la matriz Ch10PCc-F.

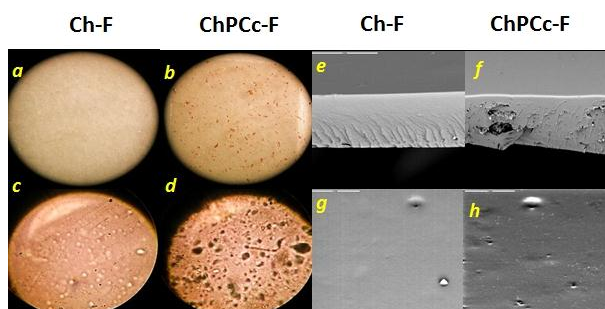


Figura 1. Superficie de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F tomadas al estéreomicroscopio (a y b), con microscopio óptico (c y d) y con microscopía electrónica de barrido (Cryo-SEM) (e-h).

Calorimetría diferencial de barrido

En los termogramas (50-400 °C) tomados en el quitosano en estado sólido se observó un amplio pico exotérmico asociado con su degradación a 313,25 °C. Las Películas Ch10-F muestran dos eventos térmicos (Fig. 2). El primer evento endotérmico se observó a $208,23 \pm 1,14$ °C (ΔH : $52,34 \pm 7,35$ J/g_{b.s.}) y se asoció con la cristalización del quitosano. El quitosano tiene una estructura cristalina rígida formada a través de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, siendolos enlaces de hidrógeno intermoleculares los responsables de las propiedades de formación de películas de este polímero (Hejazi y Amiji, 2003). El segundo evento termico, un pico exotérmico a $313,11 \pm 0,85$ °C ($T_{m\acute{a}x}$) (ΔH : $58,52 \pm 4,12$ J/g_{b.s.}), refleja la temperatura de degradación del quitosano, valores similares a los obtenidos por Cervera *et al.*, (2011) y Xu, Ren y Hanna (2006). No se detectó ninguna temperatura de transición vítrea (T_g), posiblemente debido a los efectos plastificantes del ácido láctico. La dificultad en la determinación de la T_g de materiales a base de quitosano también ha sido referida (El-Hefian, Elgannoudi, Mainal y Yahaya 2010). Las películas Ch10PCc-F muestran tres eventos térmicos: el primero se ubicó a $81,70 \pm 2,64$ °C ($3,67 \pm 1,46$ W/g_{b.s.}) y se asoció con la presencia de proteína de langostinos presentes en PCc, dado su naturaleza mayoritariamente proteica (42,27%). A

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

esta temperatura han sido descritos la hemocianina ($\sim 79^\circ\text{C}$) y la actina (70 a 75°C) (Er, Liu, Patane, Dehghani, y Gomes, 2011; Wright, Leach, y Wilding, 1977). Estas observaciones se confirmaron por la transición térmica observada a $73,57 \pm 1,12^\circ\text{C}$ ($8,57 \pm 2,13 \text{ W/g}_{b.s.}$) en el concentrado proteico (Fig. 2, recuadro). Dado que PCc proviene del cefalotórax, cabe pensar que este evento térmico corresponde a la presencia de hemocianina. El segundo pico a $209,44 \pm 3,80^\circ\text{C}$ ($66,78 \pm 8,41 \text{ W/g}_{b.s.}$) refleja la cristalización del quitosano. La desnaturalización del quitosano (tercer pico) se observó a $314,85 \pm 1,23^\circ\text{C}$ ($38,82 \pm 8,36 \text{ W/g}_{b.s.}$). Las diferencias en los valores de entalpía podrían ser conformacionales relacionados con cambios en la matriz polimérica de quitosano, provocando la inestabilidad térmica, o la formación de uniones de hidrógeno que implican una mayor estabilidad térmica (Gill, Moghadam y Ranjbar, 2010). Los valores altos de ΔH implican menor susceptibilidad al colapso de la cadena polimérica durante la fusión y la disociación, según observa Yen, Yang y Mau (2009).

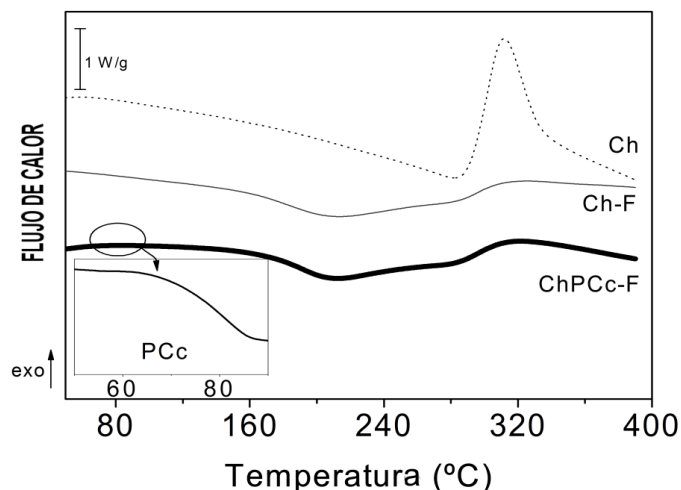


Figura 2. Termograma de quitosano sólido (Ch10), extracto lipoproteico (PCc), película de quitosano (Ch10-F) y película de quitosano y extracto lipoproteico (Ch10PCc-F).

Espectroscopía de infrarrojo FTIR

Los espectros FTIR de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F se obtuvieron para tener información sobre el estado molecular de quitosano (Fig. 3). En el espectro infrarrojo, Ch10-F exhibió un pico amplio, desde 3400 a 3000 cm^{-1} , que se asigna al estiramiento del grupo OH. El espectro no se definió de forma pronunciada debido al contenido de humedad residual. En la región de estiramiento C-H del espectro de la película Ch10-F, el pico a 2942 cm^{-1} se asignó a los modos asimétricos del CH_2 , y el pico a 2986 cm^{-1} al modo simétrico de CH_2 , que aparece desplazado a 2935 cm^{-1} en la película Ch10PCc-F, lo que es indicativo de que además el PCc contribuyó

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

significativamente con C-H en el esqueleto del quitosano. Además, la película que contiene PCc mostró otra banda a 2850 cm^{-1} , típica del grupo alquilo de las proteínas (Mezzomo *et al.*, 2011). La banda alrededor de 1720 cm^{-1} corresponde a un éster del grupo carboxílico del ácido láctico, existente como cadena lateral o libre (Zhang y Cui, 2012). Esta banda fue más intensa en Ch10-F, lo que sugirió la presencia de ácido láctico libre en la película, mientras que disminuye en la película Ch10PCc-F, lo que sugiere que el ácido láctico está más enlazado, interactuando con quitosano y PCc. El grupo amino del quitosano tiene bandas de absorción características a 1569 y 1623 cm^{-1} . En la matriz de Ch10-F, estas bandas aparecen menos intensas, lo que indica que los grupos -NH están protonados. La banda de amida (1623 cm^{-1}) de gran intensidad en la película Ch10PCc-F revela la amidación creciente debido a la presencia de PCc.

Los espectros de la segunda derivada se obtuvieron utilizando parámetros óptimos para detectar bandas componente, tantas como sea posible, y que revelen el comportamiento de la amida (Fig. 3). Así se observaron tres bandas: una a 1652 cm^{-1} (asignada a un estructura α -hélice y predominante en el espectro de Ch10PCc-F), otra en 1688 cm^{-1} (asignada a β -giros) y otra en 1632 cm^{-1} (asignado a estructuras en β -lámina antiparalela y predominantes en el espectro de Ch10-F) (Fig. 3). Por otra parte, la banda a 1652 cm^{-1} fue más pronunciada que la de 1632 cm^{-1} cuando se agregó PCc; esto indica que el dominio del C-terminal desordenado de las proteínas contribuye a la absorción del componente a 1652 cm^{-1} . Por lo tanto, concluimos que la estructura secundaria de este tramo consistió principalmente en estructuras α -hélice al azar. La heterogeneidad en las intensidades relativas de estos picos, que son conformacionalmente dependientes, reveló una fuerte interferencia causada por PCc en la matriz de quitosano. Ello sugiere que el desplazamiento de los picos a 1645 , 1640 , 1634 y 1622 cm^{-1} a frecuencias más bajas en el espectro de Ch10-F, refleja mayores auto-asociaciones del quitosano por enlaces de hidrógeno y pocas interacciones intermoleculares con PCc (Silva, Santos, Coutinho, Mano y Reis, 2005). Lawrie *et al.*, (2007) sugirió que en las películas de quitosano, las bandas en 1628 y 1633 cm^{-1} representan a la amida I y la deformación antisimétrica del -NH^{3+} , respectivamente, y que podrían estar superpuestas en Ch10PCc-F debido a la presencia de PCc. Así, la banda que aparece en 1538 cm^{-1} de la deformación simétrica de -NH^{3+} y la banda en 1575 cm^{-1} de la flexión N-H, representa de mejor manera la protonación parcial del grupo amino. Estas bandas se intensificaron cuando se incorporó PCc y la protonación aumentó, hecho que podría estar relacionado con una mejora en la actividad antimicrobiana (Fig. 3).

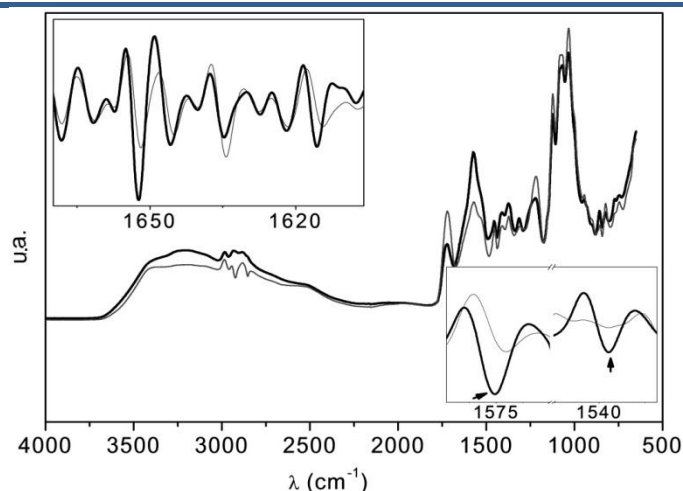


Figura 3. Espectro infrarrojo de la película de quitosano Ch10-F (línea fina) y de la película de quitosano y concentrado proteico Ch10PCc-F (línea gruesa). Los recuadros en el interior representan la segunda derivada de la Amida A y amida II.

Propiedades mecánicas

Suponiendo que las interacciones proteína–quitosano estuvieran limitadas principalmente por el pH (3,2), el extracto PCc podría ser capaz de formar su propia matriz, superponiéndose a la formada por el quitosano, o reforzándola. En cualquier caso, la adición de PCc redujo la higroscopicidad y la movilidad de cadena del polímero. El efecto de reducción de movilidad de la cadena polimérica por la concentración del plastificante fue observado por Sobral *et al.*, (2001). Además, PCc afecta a las propiedades mecánicas de las películas, disminuyendo la deformación a la punción y aumentando la fuerza de tensión y de punción al doble. Además, el aumento en el módulo de Young sugirió que PCc hace más rígida a la película (Tabla 1). Sin embargo, las películas Ch10PCc-F fueron ligeramente más extensibles, quizás debido a efectos de plastificación de ciertos componentes de PCc.

Tabla 1. Propiedades mecánicas de Ch10-F y Ch10PCc-F: Fuerza de tensión (*TS*), elongación a la rotura (*EAB*), módulo de Young (*Y*), fuerza de punción (*F*) y deformación a la punción (*D*)

Muestra	Propiedades mecánicas				
	Fuerza de tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young	Fuerza de punción (N)	Deformación (%)
Ch10-F	8,18 ± 1,90a	2,46 ± 0,19a	85,38 ± 2,54a	7,56 ± 0,15a	70,30 ± 4,12a
Ch10PCc-F	18,26 ± 1,78b	3,23 ± 0,04b	168,8 ± 10,23b	13,52 ± 0,38b	21,90 ± 1,79b

Los resultados son la media ± desviación estándar. Letras diferentes (a,b,c) en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($P \leq 0,05$)

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

La adición de PCc a la solución filmogénica de quitosano podría favorecer las propiedades mecánicas tales como la fuerza y elasticidad pero reduciendo la deformabilidad. Es bien sabido que la adición de proteínas a soluciones de quitosano afecta directamente a las propiedades mecánicas y su funcionalidad (Ferreira *et al.*, 2009). Este hecho podría estar asociado en parte a la formación de cadenas de polímeros totalmente desordenadas y disociadas, que pueden interactuar mejor, y así estas modificaciones estructurales dan lugar a películas más rígidas con propiedades mecánicas mejoradas. La combinación de proteína y quitosano dio como resultado películas con mejores propiedades mecánicas que las películas individuales. Además, las películas Ch10PCc-F podrían utilizarse como material de envase debido a su alta resistencia a la tracción.

Propiedades de barrera de agua

La adición de PCc (0,5% w/w) aumentó significativamente la permeabilidad al vapor de agua, WVP (cuadro 2). Al parecer, PCc es incompatible con el quitosano y probablemente mejora la repulsión electrostática. Un comportamiento similar se ha observado en películas de quitosano y proteína aislada de soja (SPI) (Jia, Fang y Yao, 2009). Por lo tanto, la presencia de lípidos en PCc no favorece la disminución de los valores de WVP, tal vez porque se emulsionan con la proteína en una forma muy estable (Pérez-Santín *et al.*, 2013) y son incapaces de crear un gradiente lipídico, según establece Shellhammer y Krochta (1997).

Los valores de WVP de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F desarrolladas en el presente estudio (Tabla 2) fueron inferiores a los de las películas de quitosano elaboradas sin plastificantes (H. J. Park, 1999; S. Y. Park, Marsh y Rhim, 2002) o a las de quitosano-aislado de proteína de soja, SPI (Jia *et al.*, 2009).

Como se muestra en la Tabla 2, la película Ch10-F contiene mayor humedad (dos veces más) que las películas en las que se incorporó PCc, probablemente por la presencia de un mayor número de cadenas higroscópicas en Ch10-F. Estos resultados (19,2% de humedad) son similares a los obtenidos por Park y Zhao (2004). El quitosano presenta tres sitios de absorción predominante: el grupo hidroxilo, el grupo amino y la cadena polimérica (Duan *et al.*, 2006 y Elsabee y Abdou, 2013). La presencia de lípidos (11,48%) en PCc redujo la higroscopicidad de Ch10PCc-F; además, el menor contenido de humedad en Ch10PCc-F podría estar relacionado con la presencia de pequeños péptidos hidrófobos según lo indicado por Cheung (2007) y/o probablemente a la presencia de minerales (29,38%) en PCc. Ello puede limitar el acceso de las moléculas de agua a las cadenas hidrofílicas del quitosano, dando como resultado una menor

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

humedad (Park y Zhao, 2004). Por otro lado, la actividad de agua (a_w) fue mayor en Ch10PCc-F ($0,53 \pm 0,01$) que en las películas de Ch10-F ($0,46 \pm 0,02$), probablemente porque PCc interrumpe la matriz de quitosano, liberando las regiones móviles y permitiendo aumentar la absorción de agua. Este comportamiento se ha observado en películas de almidón con sacarosa (Veiga-Santos, Oliveira, Cereda, Alves y Scamparini, 2005).

Tabla 2. Permeabilidad al vapor de agua (WVP), contenido de agua y material soluble total (TSM) de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F

Muestra	WVP	Contenido de agua	TSM
	($\times 10^{-8} \text{ g.mm.h}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	(%)	(%)
Ch10-F	$4,20 \pm 0,14a$	$21,19 \pm 1,97a$	$41,22 \pm 0,01a$
Ch10PCc-F	$12,00 \pm 0,28b$	$9,07 \pm 0,03b$	$36,02 \pm 0,09b$

Los resultados son la media \pm desviación estándar. Letras diferentes (a,b,c) en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($P \leq 0,05$)

La materia soluble total (TSM) fue superior en Ch10-F que en Ch10PCc-F, probablemente porque la proteína, altamente agregada y emulsificada con lípidos, mejora la insolubilización. Por otro lado, el quitosano, que reacciona enérgicamente con el agua debido a su alta higroscopicidad y fuertes enlaces de hidrógeno (Edrisi Sormoli, Imtiaz Ul Islam y Langrish, 2012), favorece la solubilidad en agua. A pesar de esto, ambas películas se desintegraron, pero seguían siendo insolubles a diferencia de otras películas de quitosano (K. M. Kim, Son, Kim, Weller y Hanna, 2006), probablemente debido a la ausencia de plastificantes. Como se esperaba, la resistencia al agua de Ch10-F y Ch10PCc-F fue pobre; ambas películas permitieron la filtración y se rompieron rápidamente, lo que se atribuye a las condiciones altamente ácidas con las que se prepararon las películas.

Color y propiedades de barrera a la luz

La figura 4 muestra los espectros UV-VIS de las películas en el intervalo de 200 a 800 nm. Las películas Ch10PCc-F mostraron dos bandas principales: una a 280-300 nm, típica de proteínas y compuestos fenólicos (especialmente flavonoides) y una banda entre 300-350 nm (característica de los carotenoides) (Fig. 4). Estos componentes de las películas provienen de los residuos de cabeza de langostino (Mezzomo *et al.*, 2011).

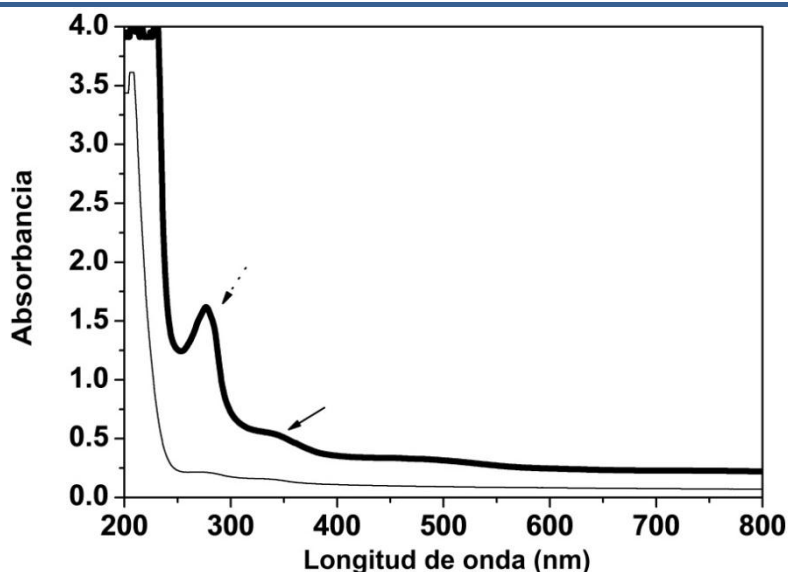


Figura 4. Cambios en la absorbancia en el intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm en las películas Ch10-F (línea fina) y Ch10PCc-F (línea gruesa).

La transparencia es una propiedad importante en los envases de alimentos. Las películas Ch10-F presentaron mayor transparencia ($\sim 83\%$) que las películas con PCc ($\sim 57\%$). La incorporación de PCc mejora la capacidad de la película para bloquear la luz visible y UV en torno al 60% (Tabla 3). Además, la presencia de PCc en las películas aumentó los valores L^* , a^* y b^* , lo que indica un incremento en la luminosidad, tendencia al enrojecimiento y al amarillo de la película Ch10PCc-F (cuadro 3), que puede atribuirse a la presencia de carotenoides (Ramayadevi, Subathira y Saravanan, 2012). Cuando los residuos de langostino se someten a un proceso térmico, por ejemplo durante una autólisis, el color rojo de la astaxantina y sus derivados fue dominante, indicando que los carotenoides no se degradan térmicamente y que podrían aparecer en forma estable mediante una emulsión y permanecer como complejos caroteno-proteína.

Tabla 3. Absorbancia a 600 nm y parámetros de color de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F

Muestra	Absorbancia 600 nm	Parámetros de Color		
		L^*	a^*	b^*
Ch10-F	$0,08 \pm 0,005a$	$36,84 \pm 1,11a$	$-0,75 \pm 0,05a$	$-0,67 \pm 0,12a$
Ch10PCc-F	$0,28 \pm 0,024b$	$38,34 \pm 3,58a$	$0,53 \pm 0,21b$	$1,06 \pm 0,64b$

Los resultados son la media \pm desviación estándar. Letras diferentes (a,b) en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($P \leq 0,05$)

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de ambas películas se determinó mediante ABTS (capacidad de captación de radicales libres) y FRAP (reducción de capacidad reducción de hierro) (Tabla 4). Los valores de ABTS y FRAP fueron superiores en Ch10PCc-F que en las películas de Ch10-F. La capacidad de captación de los radicales libres en el quitosano está en función del peso molecular y el grado de exposición del grupo amino en el polímero (K. W. Kim y Thomas, 2007). Xing *et al.*, (2005) documentaron mayor actividad antioxidante en quitosanos con menor peso molecular. Además, la capacidad antioxidante relativamente alta puede deberse a la presencia de proteína parcialmente hidrolizada en PCc. La actividad antioxidante en el quitosano y proteínas de diferentes crustáceos, incluyendo *Penaeus* sp. se ha descrito con anterioridad (Manni *et al.*, 2010). Otros factores que pueden favorecer la capacidad antioxidante son la presencia de compuestos antioxidantes no proteicos como azúcares reductores y carotenoides en PCc. En este sentido, cabe destacar el alto contenido de azúcares reductores en la película que contiene PCc, y la ausencia total de azúcares reductores en la película elaborada únicamente con quitosano.

Tabla 4. Actividad antioxidante y sustancias reactivas al Folin de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F

Muestra	ABTS (mg Vit C eq/g)	FRAP (μmol Fe/g)	Folin (mg/g)
Ch10- F	6,85 \pm 0,12a	7,70 \pm 0,05a	-
Ch10PCc-F	13,84 \pm 0,14b	15,34 \pm 0,20b	147,60 \pm 3,45b

Los resultados son la media \pm desviación estándar. Letras diferentes (a,b) en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($P \leq 0,05$)

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas, determinada por el método de difusión de disco en placa de agar, no presentó una zona de inhibición (datos no mostrados), probablemente porque los compuestos activos fueron incapaces de difundir a través de la matriz de la película al medio de agar. En este sentido, varios autores han argumentado que el quitosano en forma sólida sólo podría inhibir microorganismos que están en contacto directo con los sitios activos de la película, ya que es incapaz de difundir en forma de película (Coma *et al.*, 2002), probablemente debido a la menor disponibilidad de grupos de NH_3^+ en el quitosano y la consiguiente limitación de las propiedades antibacterianas (Elsabee y Abdou, 2013).

En el presente estudio, las películas fueron activas frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos a través del contacto directo de la película con la placa de agar. *L. acidophilus*,

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

una bacteria potencialmente beneficiosa, fue menos susceptible a la inhibición por Ch10-F o Ch10-PCc-F. Asimismo se evaluó la solución de ácido láctico (0,15 M, pH 3,2) utilizada como solvente del quitosano (como lote control) para descartar el efecto limitante del pH como el mecanismo antimicrobiano. Sin embargo, no se observó ninguna inhibición (Tabla 5).

La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido referida ampliamente en la literatura (Fernandez-Saiz, Ocio y Lagaron, 2010; Friedman y Juneja, 2010), especialmente en forma de solución (por ejemplo como recubrimientos). Así, López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos y Montero (2005) observaron que una cobertura de gelatina-quitosano prolonga la vida útil de hamburguesas de pescado e inhibe *E. coli* (Pereda, Ponce, Marcovich, Ruseckaite y Martucci, 2011). Además, los recubrimientos de quitosano impidieron el crecimiento de *L. monocytogenes* en la superficie de carne listas-para-comer (Beverly, Janes, Prinyawiwatkula y No, 2008). El modo de acción del quitosano no se ha elucidado claramente, pero se han propuesto diversos mecanismos, tales como la interacción entre las moléculas de quitosano con carga positiva y la carga negativa de la membrana celular de los microorganismos, provocando pérdida de material intracelular proteínico y otros.

La presencia de PCc aumentó significativamente la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano que pudiera ser debido a la presencia de polipéptidos antimicrobianos procedentes de la hemocianina (Decker y Jaenicke, 2004). Este comportamiento se observó en todos los microorganismos seleccionados excepto *L. acidophilus* (Tabla 5). El alto grado de protonación de los grupos amino en Ch10PCc-F (observado por FT-IR), podría ser la causa de esta mayor actividad antimicrobiana. Debido a la carga positiva en el C-2 del monómero de glucosamina de la película a pH 3,2, el quitosano aparece como una cadena más extendida (Kim y Rajapakse, 2005) y es más soluble, con mejor actividad antimicrobiana. Esta actividad podría mejorarse mediante la adición de un concentrado de proteínas que pueda contener péptidos bioactivos (Gildberg y Stenberg, 2001) o péptidos antimicrobianos como las penaeidinas de los langostinos (Rosa y Barracco, 2010). Las penaeidinas, péptidos ricos en cisteína, ejercen actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias Gram positivas y Gram negativas y microorganismos que utilizan la quitina como fuente de energía (Smith, Desbois y Dyrinda, 2010). Por otra parte, tanto las proteínas como el quitosano podrían estar cargados positivamente a pH más bajo (Devlieghere *et al.*, 2004), mejorando así la actividad antimicrobiana de las películas.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

Tabla 5. Actividad antimicrobiana (UFC/ml) de las películas Ch10-F y Ch10PCc-F frente a diferentes microorganismos.

Microorganismos	Actividad antimicrobiana (UFC/ml)		
	Control	Ch10-F	Ch10PCc-F
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	$>10^6$	$1,1 \times 10^6$	$4,1 \times 10^3$
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$>10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$>10^6$	$4,4 \times 10^4$	$9,9 \times 10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$>10^6$	$1,1 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$
<i>Salmonella choleraesuis</i>	$>10^6$	$9,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
<i>Shewanella putrefaciens</i>	$>10^6$	$1,1 \times 10^6$	$6,4 \times 10^4$
<i>Escherichia coli</i>	$>10^6$	$7,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$>10^6$	$5,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^2$

Conclusiones

El quitosano aislado de la cutícula de langostinos mediante una extracción química suave resultó altamente funcional como matriz polimérica para la formación de películas y como compuesto activo. La adición del extracto lipoproteico obtenido a partir de residuos de langostino refuerza la matriz del quitosano proporcionando una película con propiedades activas y con prometedoras aplicaciones en alimentos.

Bibliografía

- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, USA.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.
- Alvarado, J. D., Almeida, A., Arancibia, M., De Carvalho, R., Sobral, P. J., Habitante, A. M., & Sereno, A. (2007). Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables. *Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada*, 64, 605-611.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717.
- Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Peniche, C., & Higuera-Ciapara, I. (1998). Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system. *Polymer Gels and Networks*, 6(6), 429-440.
- Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkula, W., & No, H. K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25(3), 534-537.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, M. P. (2013). Effect of different protein extracts from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 118-131.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

- Brine, C. J., & Austin, P. R. (1981). Chitin variability with species and method of preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 69(2), 283-286.
- Cervera, M., Heinämäki, J., Paz, N., López, O., Maunu, S., Virtanen, T., Hatanpää, T., Antikainen, O., Nogueira, A., Fundora, J., & Yliruusi, J. (2011). Effects of Spray Drying on Physicochemical Properties of Chitosan Acid Salts. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 637-649.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162-1169.
- Conte, A., Angiolillo, L., Mastromatteo, M., & Nobile, M. A. D. (2013). *Technological Options of Packaging to Control Food Quality*. In Innocenzo Muzzalupo (Ed.), Food Industry. Chapter 16.
- Cheung, I. (2007). *Bitterness in enzymatically-produced hydrolysates of commercial shrimp (Pandalopsis dispar) processing waste*. Master Dissertation. The University of British Columbia, Canada.
- Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(7), 673-687.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714.
- Domard, A., & Rinaudo, M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(1), 49-52.
- Duan, B., Yuan, X., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, X., Zhang, Y., & Yao, K. (2006). A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning. *European Polymer Journal*, 42(9), 2013-2022.
- Edrisi Sormoli, M., Imtiaz Ul Islam, M., & Langrish, T. A. G. (2012). The effect of chitosan hydrogen bonding on lactose crystallinity during spray drying. *Journal of Food Engineering*, 108(4), 541-548.
- El-Hefian, E. A., Elgannoudi, E. S., Mainal, A., & Yahaya, A. H. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 47-56.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.
- Er, Y., Liu, D., Patane, M., Dehghani, F., & Gomes, V. (2011). Structure, thermal stability and content assay of hemocyanin from molluscs. *Chemeca 2011: Engineering a Better World: Sydney Hilton Hotel, NSW, Australia, 18-21 September 2011*, 1485.
- Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., & Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126-132.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2010). Antibacterial chitosan-based blends with ethylene–vinyl alcohol copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 874-884.
- Ferreira, C. O., Nunes, C. A., Delgadillo, I., & Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807-813.
- Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737-1761.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8–9), 809-812.
- Gill, P., Moghadam, T., & Ranjbar, B. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21(4), 167-193.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1133-1143.
- Gupta, K. C., & Jabrail, F. H. (2006). Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 43-54.
- Hejazi, R., & Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 89(2), 151-165.
- Hwang, K. T., Jung, S. T., Lee, G. D., Chinnan, M. S., Park, Y. S., & Park, H. J. (2002). Controlling Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan by Response Surface Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1876-1882.
- Jia, D., Fang, Y., & Yao, K. (2009). Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan–chitosan–soy protein isolate edible films. *Food and Bioprocess Processing*, 87(1), 7-10.
- Khan, T., Peh, K., & Ch'ng, H. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5, 205–212.
- Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S.-K., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2006). Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. *Journal of Food Science*, 71(3), E119-E124.
- Kim, K. W., & Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101(1), 308-313.
- Kim, S.-K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357-368.
- Kumirska, J., Weinhold, M. X., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2011). Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*, 3(4), 1875-1901.
- Kweon, H., Ha, H. C., Um, I. C., & Park, Y. H. (2001). Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, 80(7), 928-934.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8), 2533-2541.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and Characterization of Chitin, Chitosan, and Protein Hydrolysates Prepared from Shrimp Waste by Treatment with Crude Protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R. L., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), 1383-1391.
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S., & Mima, S. (1980). Ir spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(5), 323-324.
- Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M., & Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 521-526.
- Nyström, B., Kjønksen, A.-L., & Iversen, C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(2–3), 81-103.
- Park, H. J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 10(8), 254-260.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

- Park, S.-i., & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933-1939.
- Park, S. Y., Marsh, K. S., & Rhim, J. W. (2002). Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. *Journal of Food Science*, 67(1), 194-197.
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1372-1381.
- Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 53-61.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 87-94.
- Ramyadevi, D., Subathira, A., & Saravanan, S. (2012). Potential Recovery of Protein from Shrimp Waste in Aqueous two Phase System. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2(7), 47-52.
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- Roberts, G. A. F., & Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(6), 374-377.
- Rødde, R. H., Einbu, A., & Vårum, K. M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*, 71(3), 388-393.
- Romero, A., Verwijlen, T., Guerrero, A., & Vermant, J. (2013). Interfacial behaviour of crayfish protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 470-476.
- Rosa, R. D., & Barracco, M. A. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans *Invertebrate Survival Journal*, 7, 262-284.
- Shellhammer, T. H., & Krochta, J. M. (1997). Whey Protein Emulsion Film Performance as Affected by Lipid Type and Amount. *Journal of Food Science*, 62(2), 390-394.
- Silva, S. S., Santos, M. I., Coutinho, O. P., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2005). Physical properties and biocompatibility of chitosan/soy blended membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(6), 575-579.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine drugs*, 8(4), 1213-1262.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 423-432.
- Sowmya, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. M. (2011). An Autolytic Process for Recovery of Antioxidant Activity Rich Carotenoprotein from Shrimp Heads. *Marine Biotechnology*, 13(5), 918-927.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food Chemistry*, 68(2), 147-152.
- Valdez-Peña, A., Espinoza-Perez, J., Sandoval-Fabian, G., Balagurusamy, N., Hernandez-Rivera, A., De-la-Garza-Rodriguez, I., & Contreras-Esquivel, J. (2010). Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), 553-557.

Capítulo 4. Desarrollo de películas activas de quitosano obtenido por una extracción química suave, con la incorporación de un concentrado proteico recuperado a partir de residuos de langostinos

- Veiga-Santos, P., Oliveira, L. M., Cereda, M. P., Alves, A. J., & Scamparini, A. R. P. (2005). Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 341-349.
- Wright, D. J., Leach, I. B., & Wilding, P. (1977). Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(6), 557-564.
- Xing, R., Liu, S., Guo, Z., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, Z., & Li, P. (2005). Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(5), 1573-1577.
- Xu, Y., Ren, X., & Hanna, M. A. (2006). Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 99(4), 1684-1691.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H., & Mau, J.-L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 15-21.
- Yu, S.-H., Hsieh, H.-Y., Pang, J.-C., Tang, D.-W., Shih, C.-M., Tsai, M.-L., Tsai, Y.-C., & Mi, F.-L. (2013). Active films from water-soluble chitosan/cellulose composites incorporating releasable caffeic acid for inhibition of lipid oxidation in fish oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 9-19.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of chitosan: Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, 4(8), 1399-1416.
- Zhang, Y., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., & Fu, X. (2006). Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 229-234.
- Zhang, Z., & Cui, H. (2012). Biodegradability and biocompatibility study of poly (chitosan-g-lactic acid) scaffolds. *Molecules*, 17(3), 3243-3258

Capítulo 5. Coberturas de quitosano enriquecidos con materiales activos de residuos de langostino para la conservación de langostinos

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló una cobertura activa compuesta por quitosano (Ch10) y un extracto lipoproteico de langostino (PCc), ambos obtenidos de residuos de *Litopenaeus vannamei*, para conservar langostinos almacenados en estado refrigerado. La adición de PCc aumentó la capacidad antioxidante de la cobertura de quitosano y redujo la viscosidad de la solución, que fue lo suficientemente viscosa para permitir su adhesión a los langostinos y mantener su actividad antimicrobiana. Durante el ensayo, los resultados demostraron que la cobertura Ch10, especialmente cuando se enriquece con PCc (Ch10-PCc), retrasa el crecimiento microbiano, principalmente a través de la extensión de la fase de latencia. El grupo de *Pseudomonas* spp., fue la microbiota dominante. Los organismos productores de H₂S y las colonias luminiscentes resultaron especialmente sensibles a este recubrimiento activo, con una inhibición superior a 4 y 2 unidades logarítmicas, respectivamente. Por el contrario, el crecimiento de bacterias lácticas no se vio favorecido. El recubrimiento Ch10-PCc también retrasó el proceso de melanosis y no confirió sabor u olor perceptible durante la evaluación sensorial. La aplicación de esta cobertura podría ser prometedora para mejorar la calidad de los langostinos durante la conservación en estado refrigerado.

Palabras clave: *residuos de langostino, recubrimiento de quitosano, extracto lipoproteico, conservación de langostinos, microorganismos, melanosis.*

Introducción

Los langostinos son altamente susceptibles al deterioro y la alteración por microorganismos durante el almacenamiento. Entre los métodos que con frecuencia se utilizan para su conservación están la congelación, el almacenamiento en frío o la combinación de salmuera y frío. Estos métodos a menudo no ralentizan con éxito el deterioro y en ocasiones producen cambios sensoriales inaceptables que van en detrimento de la calidad de los langostinos. Además, el deterioro puede agravarse con la melanosis o pardeamiento enzimático, proceso que se produce tan pronto como los crustáceos se pescan o recolectan, incluso cuando se conservan en hielo o a bajas temperaturas. La melanosis es un mecanismo natural *post mortem* que implica la acción de un complejo enzimático, la polifenoloxidasas (PPO), que en presencia del oxígeno forma compuestos que pueden polimerizar en pigmentos insolubles (McEvily, Radha, y Otwell, 1991). Para mitigar este problema se utilizan formulaciones antimelanósicas a base de sulfitos. Sin embargo, las reacciones adversas en torno a los sulfitos descritas en los últimos años (Simon, 1992) conducen a la búsqueda de compuestos

alternativos de origen natural para reducir la melanosis, compuestos tales como el quitosano (López- Caballero, Martínez- Álvarez, Gómez- Guillén, y Montero, 2006).

El quitosano un polímero natural que se obtiene a partir de los exoesqueletos de los crustáceos, juega un papel importante por su bien documentada actividad antimicrobiana (Kong, Chen Xing, y Park, 2010; HK No, Meyers, Prinyawiwatukul, y Xu, 2007) y antioxidante (Kim y Thomas, 2007). Los métodos para la obtención de quitosano generalmente implican un consumo importante de reactivos químicos, con el consiguiente problema económico y ambiental derivado de la gestión de residuos. Recientemente se ha descrito un método ecológico para obtener quitosano con propiedades similares (peso molecular, grado de desacetilación) a los de quitosanos comerciales (Arancibia *et al.*, 2014).

Hoy en día, resulta interesante el desarrollo de nuevos materiales de envasado para la conservación de alimentos, en especial si estos materiales son polímeros naturales procedentes de productos agrícolas y/o productos de desecho de los alimentos (Vásconez, Flores, Campos, Alvarado, y Gerschenson, 2009). Los recubrimientos comestibles pueden mejorar la calidad de los productos alimenticios, ya sea disminuyendo la oxidación de los lípidos, previniendo la pérdida de funcionalidad de las proteínas y la formación de malos olores, así como también reduciendo las pérdidas de humedad y la decoloración (Lu, Liu, Ye, Wei, y Liu, 2009; Nussinovitch, 2009; Sathivel, 2005; Wu *et al.*, 2000). Uno de los enfoques que se puede dar es el desarrollo de películas o recubrimientos antimicrobianos utilizando polímeros antimicrobianos aplicados en la superficie de los productos alimenticios (López- Caballero, Gómez- Guillén, Pérez- Mateos, y Montero, 2005a; Ojagh, Sahari, Rezaei, y Hosseini, 2011; Salgado, López- Caballero, Gómez- Guillén, Mauri, y Montero, 2013) o mediante la incorporación de compuestos bioactivos en las películas o recubrimientos (Cagri, Ustunol, y Ryser, 2004; Lu *et al.*, 2009; Nussinovitch, 2009).

Las funcionalidades de varios materiales incluyendo polisacáridos, proteínas o lípidos y sus derivados, solos o en combinación, han sido ampliamente investigados como recubrimientos o material de soporte comestible (Nussinovitch, 2009). En los últimos años se han desarrollado recubrimientos antimicrobianos en base a quitosano con la incorporación de materiales bioactivos naturales (Guo *et al.*, 2013; Li, Li, Hu, y Li, 2013). Recientemente, la adición de un concentrado de caroteno-proteínas a un recubrimiento de quitosano parece ser prometedor a la hora de conferir propiedades activas (Arancibia *et al.*, 2014). Sin embargo, no existe información disponible sobre la aplicación de un recubrimiento comestible en base a la mencionada mezcla para conservar de alimentos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un

recubrimiento antimicrobiano a partir de nuevos materiales activos: quitosano y extracto lipoproteico de langostino para extender la vida útil de los langostinos crudos durante su almacenamiento en refrigeración.

Materiales y métodos

Preparación de soluciones de recubrimiento

La solución de partida de quitosano (Ch10) y la solución del extracto lipoproteico de langostino (PCc) se prepararon por separado. El quitosano sintetizado como se describió anteriormente (75,5% de desacetilación) se disolvió en ácido láctico 0,15 M a una concentración final de 2% (p/v). Por separado, el extracto lipoproteico (PCc) (42,27 % de proteína, 11,48 % de lípidos) se dispersó en ácido láctico 0,15 M en una concentración de 1% (p/v) y se sometieron a ultrasonidos (Q700, Qsonica, CT, EE.UU.) durante 1 min a 100% de la amplitud. La solución de recubrimiento de quitosano (Ch10) se preparó mezclando la solución de quitosano de partida con la solución de ácido láctico 0,15 M (1:1 v/v) hasta una concentración final de quitosano de 1% (p/v). La solución de recubrimiento extracto lipoproteico-quitosano (Ch10-PCc) también se preparó hasta una concentración final de quitosano y PCc de 1 % y 0,5 % (p/v) respectivamente.

Viscosidad de soluciones de recubrimiento

La viscosidad de soluciones de recubrimiento se determinó a $25 \pm 0,1$ °C mediante un reómetro Bohlin CVO- 100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido) con una geometría cono-placa (ángulo de cono de 4, la brecha de 0,15 mm), a una velocidad de cizallamiento constante de $0,5 \text{ s}^{-1}$. Los resultados fueron el promedio de cinco determinaciones y se expresaron como mPa.s.

Propiedades antioxidantes

Para medir la capacidad antioxidante de los recubrimientos (Ch10, Ch10-PCc) se utilizaron las técnicas de radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) y FRAP (capacidad de reducción del ión férrico). Ambos recubrimientos se disolvieron en agua destilada y se agitaron hasta que la solución estuviera totalmente homogénea. Las soluciones se filtraron a través de un papel Whatman N ° 1. El método utilizado para el ensayo de FRAP y ABTS fue descrito previamente por Alemán, Giménez, Montero, y Gómez- Guillén, (2011). Los resultados de la capacidad antioxidante se expresaron como moles Fe^{2+} equivalentes/g para

FRAP y mg Vitamina C Equivalente/g (VCEAC/g) para ABTS, basado en las curvas de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y vitamina C, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

El contenido total de sustancias reactivas al Folin se determinó espectrofotométricamente por triplicado utilizando ácido gálico como estándar de acuerdo con un método modificado de Slinkard y Singleton, (1977) utilizando el reactivo de la Folin Ciocalteu. Una alícuota de 10 μL de muestra se mezcló con 750 μL de agua destilada y se oxidó con 50 μL de reactivo de Folin Ciocalteu. La reacción se neutralizó con 150 μL de solución de carbonato de sodio y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución en color azul se midió a 765 nm (UV- 1601, modelo CPS- 240, Shimadzu, Kyoto, Japón). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (GA) equivalente/g de muestra. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Ensayo de conservación de langostinos

Los langostinos (*L. vannamei*) fueron adquiridos en un mercado local y se dividieron al azar en los siguientes lotes a los que se aplicó los distintos tratamientos: langostinos revestidos con una cobertura de quitosano (Ch10), langostinos revestidos con una solución producto de la mezcla de extracto lipoproteico-quitosano (Ch10-PCc), langostinos recubiertos con una solución 0,15 M de ácido láctico (LA), y langostinos sin recubrimiento utilizados como lote control (C). En todos los casos, los langostinos se sumergieron durante 1 min en cada solución de recubrimiento, se envasaron en bolsas de polietileno (Cofresco®, Minden, Alemania) y almacenaron a 5 °C durante 15 días. Se tomaron muestras periódicamente.

pH

Aproximadamente 5 g de langostinos pelados se homogeneizaron con agua destilada (1:2, p/v) a temperatura ambiente durante 5 min. El pH se determinó con un pH - metro (pHm93) y un electrodo de pH combinado (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

TVB- N

La determinación del nitrógeno básico volátil total (TVB- N) se llevó a cabo durante el período de almacenamiento mediante el método de Antonacopoulos y Vyncke, (1989). Las muestras de langostinos pelados (10 g) se homogeneizaron con 90 mL de ácido perclórico (6 %) en un Osterizer (a 5000 rpm durante 1 min) para precipitar las proteínas. La mezcla obtenida se filtró

a través de un filtro de papel Whatman N ° 1, se lavó con 5 mL de ácido perclórico y se ajustó hasta 100 mL. El filtrado se destiló en un equipo Tecator AB (modelo 1002, Kjeltex Systems, Suecia). El destilado se recogió en ácido bórico (0,3 % p/v) y se valoró con 0,05 moles/L de HCl. Los análisis se realizaron al menos por triplicado, y los resultados se expresaron como mg NBVT/100 g de músculo.

Actividad antimicrobiana

Para determinar el efecto antimicrobiano del recubrimiento durante el almacenamiento, los langostinos se pelaron asépticamente y una cantidad de 10 g (de 8 individuos diferentes al menos) se pesaron y se transfirieron a bolsas estériles (Sterilin, Piedra, Staffordshire, Reino Unido), con 90 mL de agua de peptona 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se agitó vigorosamente durante 1 minuto en un mezclador Stomacher (modelo Colworth 400, Seward, Londres, Reino Unido). Se prepararon diluciones apropiadas para la determinación de los siguientes microorganismos : (i) recuento de bacterias totales (TBC) en placas de agar hierro (Scharlab, Barcelona, España) con 1% de NaCl, que se incubaron a 15 °C durante 3 días, (ii) organismos productores de H₂S, como colonias negras, en placas de agar hierro que se incubaron a 15 °C durante 3 días, (iii) bacterias luminiscentes en placas de agar hierro con 1 % NaCl incubadas a 15 °C durante 5 días, (iv) aerobios mesófilos totales en agar para recuento en placa PCA (Oxoid) que se incubaron a 30 °C durante 72 h, (v) *Pseudomonas*, en placas de agar base para *Pseudomonas* (Oxoid) con suplemento para *Pseudomonas* spp. (Oxoid) CFC (Cetrimida, Fucidine, cefalosporina) incubadas a 25 °C durante 48 h; (vi) Enterobacteriaceae en placas con doble capa de agar bilis rojo violeta (VRBG, Oxoid) se incubaron a 30 °C durante 48 h, y (vii) bacterias lácticas en doble capa de agar MRS agar (Oxoid) se incubaron a 30 °C durante 72 h. Todos los recuentos microbiológicos se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC/g). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El día en que se recubrieron los langostinos se tomó como día 0.

Parámetros de color

Los parámetros de color: luminosidad (L *), tendencia al rojo (a *) y al amarillo (b *) se midieron usando un colorímetro CM-3500D Konica Minolta (Osaka, Japón). Las mediciones se realizaron en diferentes lugares del caparazón de los langostinos y cada punto fue la media de al menos nueve medidas.

Análisis Sensorial

Para juzgar las diferencias debidas a la aplicación de las soluciones de recubrimiento de quitosano y quitosano-extracto lipoproteico, se realizó una prueba triangular (UNE87 -006 -92) en langostinos cocidos. De ese modo los langostinos se recubrieron con las soluciones de Ch10, Ch10-PCc y ácido láctico 0,15 M, y y se conservaron durante tres días a 4 °C. Un panel de catadores compuesto por diez panelistas semi - entrenados probaron las muestras después de quitar la cáscara de langostino siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE.

Durante todo el período de conservación, los panelistas evaluaron la apariencia de langostino cada 2-3 días (ocho individuos por tratamiento por evaluación) según López- Caballero, Martínez- Álvarez, Gómez- Guillén, y Montero, (2007) con algunas modificaciones. Los panelista evaluaron el olor y sabor de acuerdo con una escala de 0 a 5, donde 0 = típico, característico y 5 = anormal, mal olor. Del mismo modo, la melanosis fue evaluada de acuerdo con una escala de 0 a 5, donde 0 = ausencia completa de manchas negras y 5 = manchas sustanciales sobre todo el langostino.

Análisis estadístico

, El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de dos vías (dos factores: lotes y tiempo de conservación). Las diferencias entre los pares de medias se evaluaron con la prueba de Tukey, con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$, utilizando el programa Graph Pad Prism v5.03 (GraphPad Software, California, EE.UU.). Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar.

Resultados y discusión

La cobertura de quitosano (Ch10) presentó una notable capacidad antioxidante, tanto por ABTS (45,25 mg Vit C eq/g) como por FRAP (85,39 μ mol de Fe/g). Estos valores fueron ligeramente superiores a los obtenidos por Arancibia *et al.*, (2014) utilizando un quitosano con un mayor grado de desacetilación. Según Kim *et al.*, (2007) la capacidad del quitosano como un captador de radicales libres se atribuye principalmente al grado de exposición de los grupos amino, que va en función de su peso molecular. La adición de PCc a la formulación aumentó significativamente ($P \leq 0,05$) los valores de ABTS y FRAP (Tabla 1). Se ha descrito que los extractos de carotenoproteínas obtenidos de residuos de langostino blanco del Pacífico (*L. vannamei*) poseen una gran capacidad para captar radicales libres y un alto poder de reducción de iones férricos (Senphan, Benjakul, y Kishimura, 2013; Binsan *et al.*, 2008.).

Capítulo 5. Coberturas de quitosano enriquecidos con materiales activos de residuos de langostino para la conservación de langostinos

Además, Arancibia *et al.*, (2014) observaron que la actividad antioxidante de una solución de quitosano mejora debido a la adición de un extracto lipoproteico procedente de residuos de langostino.

Tabla 1. Actividad antioxidante y sustancias reactivas al Folin para las coberturas de quitosano (Ch10) y quitosano-extracto lipoproteico (Ch10-PCc).

Muestra	ABTS (mg Vit C eq/g)	FRAP (μ mol Fe/g)	Folin (mg/g)
Ch10	45,25 \pm 0,36a	85,39 \pm 0,40a	-
Ch10-PCc	118,2 \pm 7,74b	315,2 \pm 2,14b	222,9 \pm 14,63

Los resultados son la media \pm desviación estándar.: diferentes letras (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Como se muestra en la Tabla 1, los fenoles totales de la solución de quitosano aumentaron significativamente con la incorporación de PCc, lo que fue acorde con resultados anteriores (Arancibia *et al.*, 2014) y puede estar asociado a la presencia de sitios activos o radicales libres en PCc. Casettari, Gennari, Angelino, Ninfali, y Castagnino, (2012) también observaron valores de fenoles totales muy bajos en quitosano nativo. Algunos autores han caracterizado compuestos antioxidantes naturales presentes en los residuos de langostinos, principalmente de tipo fenólico (Seymour, Li, y Morrissey, 1996). Además, la presencia de péptidos antioxidantes en el concentrado proteico (He, Chen, Sun, Zhang, Y Gao, 2006; Mendis, Rajapakse, Byun, y Kim, 2005) también podría contribuir a la reacción positiva al reactivo de Folin.

La cobertura de quitosano (Ch10) fue más viscosa (5,86 Pa.s) que la cobertura de mezcla Ch10-PCc (2,68 Pa.s). Se ha descrito que la alta viscosidad de quitosano podría estar relacionada con una fuerte capacidad de adhesión (Yamada *et al.*, 2000). En este sentido, Jeon *et al.*, (2002) afirmaron que la viscosidad y la eficacia como conservante del quitosano se relacionan entre sí (mayor viscosidad, mayor la eficacia). En el presente trabajo, el PCc podría alterar la red de quitosano rompiendo los enlaces de hidrógeno, lo que conduce a una disminución en la viscosidad. Por otra parte, la presencia de lípidos en PCc (11,48 %) podría hacer que actúe como un agente tensoactivo, efecto que daría lugar a la caída de la viscosidad del sistema (Nyström, Kjøniksen, y Iversen, 1999). A pesar de que el recubrimiento Ch10-PCc exhibió valores de viscosidad más bajos y por lo tanto menos adherencia, esta cobertura compuesta fue más eficaz para inhibir el crecimiento microbiano, como se describe a continuación.

Ensayo de conservación de langostino

Al inicio del ensayo, el pH del músculo de langostino fue de 7,25. Este valor se ajusta a los documentados para langostinos congelados (*Parapenaeus longirostris*) (Gonçaves, López-Caballero, y Nunes, 2003; López- Caballero *et al.*, 2007.). El pH se incrementó durante la conservación y los valores más bajos ($\approx 7,6$) se registraron en el lote Ch10-PCc, a los 15 días ($p \leq 0,05$). Para evaluar el efecto del medio ácido en el que se disolvió el quitosano, los langostinos se sumergieron en una solución de ácido láctico 0,15 M y los resultados obtenidos fueron similares a los del lote control (Fig. 1A). En este sentido, Martínez- Álvarez, López- Caballero, Montero, y Gómez- Guillén, (2005) observaron que la presencia de ácido en soluciones antimelanosicas para langostinos (*Marsupenaeus japonicus*) no disminuye el pH en el músculo debido a su capacidad tampón. El aumento en los valores de pH refleja la producción de metabolitos bacterianos básicos durante el deterioro de los langostinos, lo que guarda relación con un aumento en el nitrógeno básico volátil total (TVBN).

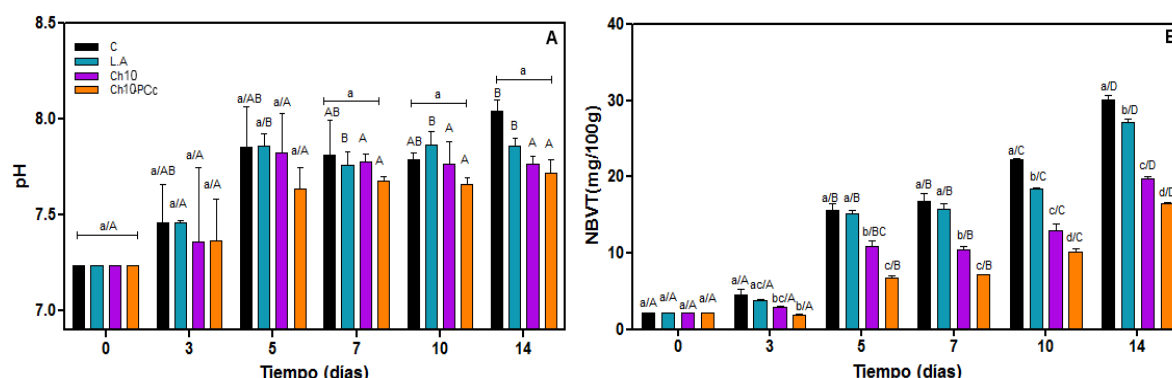


Figura 1. Evolución del A) pH y B) contenido de nitrógeno básico volátil total (TVB- N) durante el almacenamiento de langostinos (*L. vannamei*) en estado refrigerado

Los langostinos mostraron un aumento en el TVBN durante la conservación, que variaba en función del tratamiento ($p \leq 0,05$). El valor inicial de nitrógeno básico volátil total en los langostinos fue de 7,1 mg TVBN/100 g (Fig. 1B), valores similares a los obtenidos por Huang, Chen Qiu, y Li, (2012); y Wang *et al.*, (2014) en langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*). La cobertura de quitosano retrasó la formación TVBN respecto al lote control y al de ácido láctico, y resultó aún más eficaz cuando se incorporó en la formulación PCc (Fig. 1B). En la bibliografía se han documentado retrasos en la producción de compuestos TVBN en langostinos recubiertos con 1-1,5% de quitosano -O carboximetilcelulosa y 1-1,5 % de quitosano (Huang *et*

al., 2012), así como 2% de quitosano (Simpson, Gagne, Ashie, y Noroozi, 1997). Según algunos autores, los langostinos que contienen hasta 30 mg TVBN/100 g podrían considerarse como aceptables y están en el límite de langostino fresco y congelado (Nirmal y Benjakul, 2011). En el presente trabajo, el lote de control excede este valor al final del ensayo de conservación, mientras que la concentración en el lote Ch10-PCc fue prácticamente la mitad (Fig. 1B).

Los recuentos de bacterias totales al inicio del experimento registraron valores alrededor de 2,5 log UFC/g (Fig. 2a). López-Caballero *et al.*, (2002) obtienen recuentos entre 2-3 log UFC/g (Iron Agar, 1% NaCl) en langostino rosado fresco recién capturado (*Parapenaeus longirostris*). Todos los lotes evolucionaron de manera similar, excepto el lote Ch10-PCc, cuyos recuentos estuvieron 1,5 ciclos logarítmicos por debajo hasta el día 10. A partir de este momento los recuentos aumentaron hasta llegar a 9,8 log UFC/g al final de la conservación ($p \geq 0,05$). Un comportamiento similar se observó en los recuentos de microorganismos viables aerobios mesófilos, *Pseudomonas* y bacterias lácticas (Fig. 2 D, E, F, respectivamente). En el lote Ch10-PCc se observó un aumento en la fase de latencia de hasta 7 días en los microorganismos mesófilos y bacterias lácticas, que además se corresponde con los menores recuentos. Estas diferencias alcanzaron hasta 3 unidades logarítmicas en mesófilos totales ($p \leq 0,05$) a los 7 días. En hamburguesas de bacalao cubiertas con quitosano (López- Caballero *et al.*, 2005a) y langostinos cultivados (*Marsupeanaeus tigre*) tratados con quitosano como fórmula antimelanósica (López- Caballero *et al.*, 2006), la presencia de la cobertura de quitosano parece estimular ligeramente el crecimiento de bacterias lácticas, probablemente porque el pH de la superficie de las hamburguesas fue inferior gracias a la solución de ácido en donde se disolvió el quitosano. En este sentido, los oligosacáridos de quitosano mostraron un efecto bifidogénico a concentraciones entre 0,1 y 0,5% y tuvo un efecto estimulante sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis* a 0,1% (Lee, Park, Jung, y Shin, 2002). En el presente estudio, el aumento en los recuentos de bacterias lácticas con la cobertura Ch10 no fue significativa ($p \geq 0,05$).

También se observó un crecimiento exponencial en los organismos productores de H₂S de los lotes control (C y LA) desde las primeras etapas del ensayo ($p \leq 0,05$). Las formulaciones con quitosano (Ch10) y quitosano con extracto lipoproteico (Ch10-PCc) aumentaron la fase de latencia de estos organismos, considerados como presuntos *S. putrefaciens* (López- Caballero, Sánchez -Fernández, y de Moral, 2001) hasta 7 y 10 días, respectivamente (Fig. 2B).

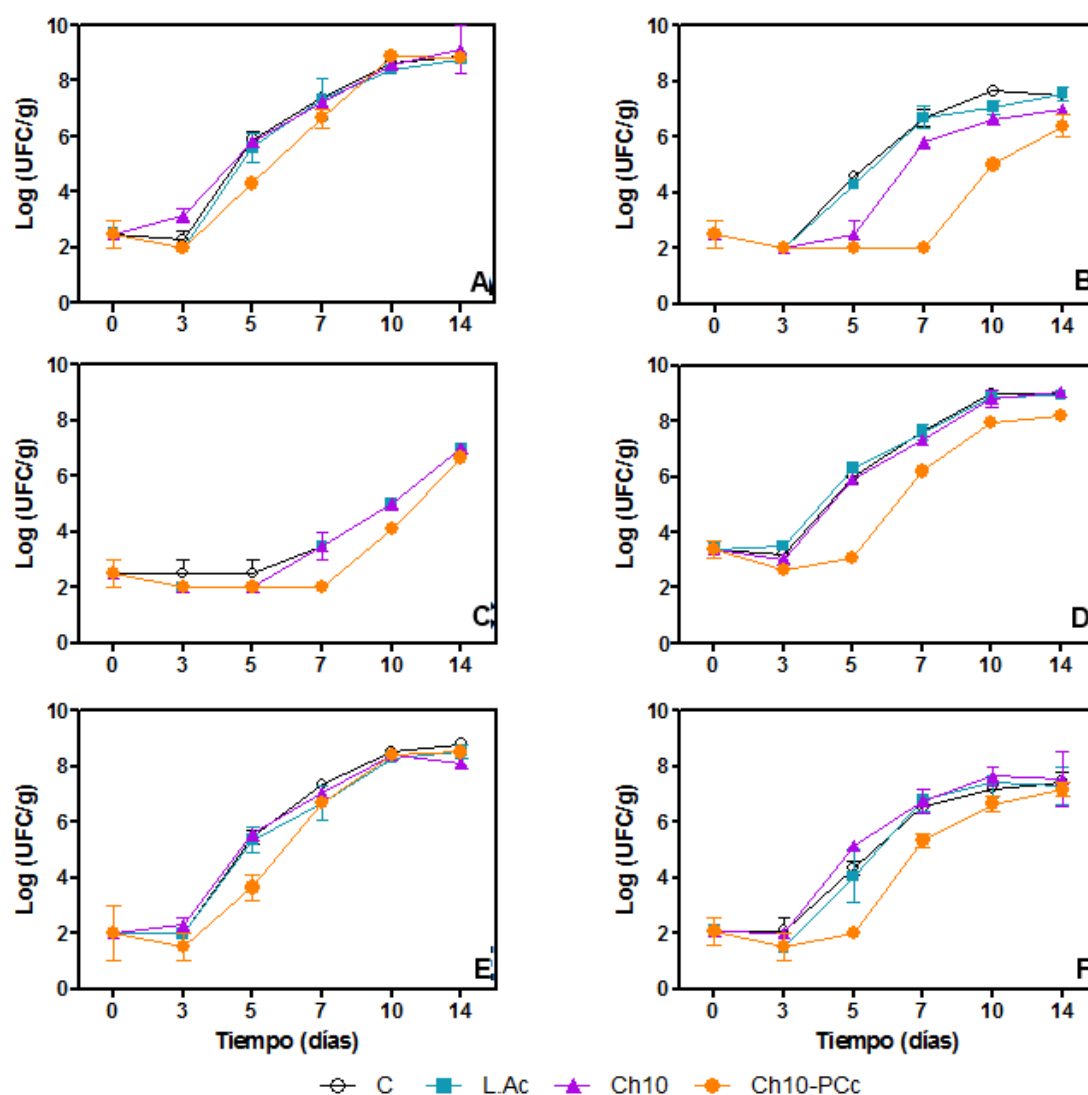


Figura 2. Recuentos microbiológicos (log UFC/g) en langostinos crudos (*L. vannamei*) almacenados en estado refrigerado a 4°C. A) microorganismos totales, B) productores de H₂S, C) bacterias luminiscentes, D) mesófilos aerobios totales, E) *Pseudomonas* sp., F) bacterias lácticas. En muestras sin cobertura (C), con cobertura de ácido láctico 0,15M (LA), quitosano (Ch10) y quitosano con extracto lipoproteico (Ch10-PCc).

La sensibilidad de los microorganismos productores de H₂S o *S. putrefaciens* al quitosano ha sido descrita previamente (Arancibia *et al.*, 2014; López- Caballero *et al.*, 2005a; López- Caballero, Gómez- Guillén, Pérez- Mateos, y Montero, 2005b; López- Caballero *et al.*, 2006). Cuando se utilizaron películas de acetato de quitosano sobre filetes de merluza con diferentes tratamientos de envasado (aire y vacío), la fase de adaptación se incrementó y se redujo el número total de bacterias productoras de H₂S (Fernández- Saiz, Sánchez, Soler, Lagaron, y Ocio, 2013). Del mismo modo, los recuentos de bacterias luminiscentes (presuntos *P. phosphoreum*) (López- Caballero, Gonçalves, y Nunes, 2002) se mantuvo constante durante 10

días en el lote Ch10-PCc ($p \leq 0,05$), momento a partir del cual se produjo un crecimiento hasta llegar a 6 log UFC/g (Fig. 2C). El efecto inhibitorio del quitosano (0,27% p/p) sobre las colonias luminiscentes (recuentos < límite de detección) se ha descrito en langostinos (López - Caballero *et al.*, 2006). *Pseudomonas* fueron la microbiota dominante durante la conservación en frío de langostinos. De acuerdo a esto, la escasa inhibición ejercida por el quitosano sobre el género *pseudomonas* en comparación con otros microorganismos Gram positivos y Gram negativos se ha referido con anterioridad. López-Caballero *et al.*, (2006); y Simpson *et al.*, (1997) atribuyen la gran resistencia de las *pseudomonas*, en comparación con las bacterias Gram –positivas, al efecto protector de la membrana externa de las células Gram-negativas.

La actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano aplicados a los productos pesqueros y de cómo contribuyen a mantener la estabilidad de los alimentos se ha descrito previamente (Fernández- Saiz *et al.*, 2013; Jeon, Kamil, y Shahidi, 2002; López- Caballero *et al.*, 2005a). Sin embargo, en nuestro conocimiento, no existe información disponible sobre la aplicación de un recubrimiento producto de la mezcla de un extracto lipoproteico con quitosano en la conservación de pescados y mariscos. La actividad antimicrobiana de Ch10-PCc podría atribuirse a la carga positiva en el C-2 del monómero de glucosamina del quitosano a pH 3,2 (Feng *et al.*, 2006; No, Park, Lee, y Meyers, 2002) y al efecto del extracto lipoproteico que también podría estar cargado positivamente a pH bajo (Devlieghere, Vermeulen, y Debevere, 2004), mejorando así la actividad antimicrobiana del recubrimiento. A través del ensayo de difusión en disco en placa de agar, la incorporación del extracto lipoproteico aislado durante el proceso de aprovechamiento de residuos mejora la actividad antibacteriana del recubrimiento de quitosano (Arancibia *et al.*, 2014). Este hecho podría estar asociado a la presencia de diversas fracciones de péptidos con actividad antimicrobiana (producidas en el proceso de recuperación del extracto lipoproteico) que podrían ejercer su actividad. En este sentido, Rosa y Barracco, (2010) observaron la presencia de péptidos antimicrobianos, penaeidinas, en langostino (*Penaeus sp.*). Los péptidos antimicrobianos se han descritos como de naturaleza catiónica y anfipática y con bajo peso molecular (por lo general menos de 10 kDa) y una gran proporción de residuos hidrofóbicos (Azmi *et al.*, 2013; Dürr, Sudheendra, y Ramamoorthy, 2006). En el presente trabajo, el extracto lipoproteico añadido al recubrimiento de quitosano contiene una cantidad significativa de residuos de aminoácidos hidrófobos, como arginina, prolina, glicina, triptófano, entre otros (Arancibia *et al.*, 2014). La actividad antimicrobiana de péptidos con un perfil aminoacídico similar se ha referido con anterioridad (Rosa y Barracco, 2010).

Capítulo 5. Coberturas de quitosano enriquecidos con materiales activos de residuos de langostino para la conservación de langostinos

Los resultados microbiológicos están relacionados con los valores de nitrógeno básico volátil total y el pH obtenidos. Los valores TVB-N y el incremento en el pH son un indicador de alteración y deterioro y deben atribuirse esencialmente al amoníaco producido a partir del catabolismo bacteriano de compuestos que contienen nitrógeno (LeBlanc y Gill, 1984). De hecho, Nirmal y Benjakul, (2009) observaron que los langostinos no podían considerarse aceptables a $\text{pH} > 7,6$. En el presente trabajo, los valores de pH cercanos a 7,6 se registraron en el lote Ch10-PCc prácticamente hasta el final del tiempo de conservación, mientras que en los demás lotes este valor se superó tras 7 días. Por otro lado, el recubrimiento en base a quitosano no produjo sabores desagradables durante el periodo estudiado, según se describe a continuación.

Los cambios de color en los langostinos durante la conservación se muestran en la Figura 1. Los valores de L^* disminuyeron en todos los lotes durante el de almacenamiento (Figura 3A). El lote control presentó una reducción de 12 puntos por debajo del valor inicial al final del experimento ($L^* = 29$). Este hecho se puede atribuir a la aparición de manchas negras (melanosis). La incorporación de PCc en el recubrimiento de quitosano contribuyó, en cierta medida, al mantenimiento de los valores L^* , ya que la caída en el lote Ch10-PCc fue inferior (4 puntos). Los langostinos recubiertos con Ch10-PCc mostraron una tendencia hacia el rojo (a^*), existiendo diferencias significativas entre este lote y el resto durante todo el periodo de conservación ($p \leq 0,05$). Este lote además presentó un retraso notable en la aparición de melanosis (Fig. 3B). Los valores b^* se incrementaron durante el almacenamiento siguiendo una tendencia similar ($p \leq 0,05$) a la del parámetro a^* (Fig. 3C).

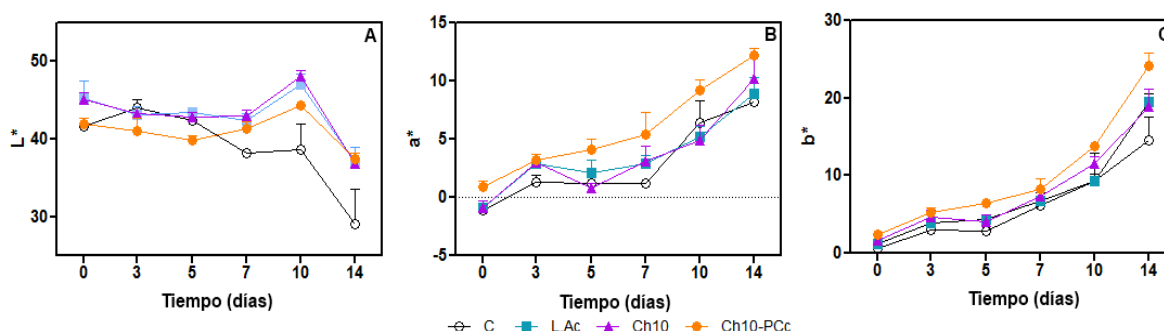


Figura 3. Parámetros de color A) L^* , B) a^* y C) b^* en langostinos (*L. vannamei*) almacenados a 4°C durante 14 días. En muestras sin cobertura (C), con cobertura de ácido láctico 0,15M (LAc), quitosano (Ch10) y quitosano con extracto lipoproteico (Ch10-PCc)

La prueba triangular reveló que inicialmente los panelistas no fueron capaces de detectar diferencias en el sabor (olor y sabor) entre los langostinos control, con cobertura de quitosano (Ch10 y Ch10-PCc) y los langostinos sumergidos en la solución de ácido láctico 0,15M (LA). Todos los lotes se consideraron como similares (Fig. 4). Por lo tanto, el PCc incorporado en la cobertura de quitosano no produjo un rechazo sensorial, pudiendo utilizarse esta mezcla como un recubrimiento bioactivo para langostino. Por el contrario, Han, Lederer, McDaniel, y Zhao, (2005) encontraron que las soluciones de quitosano desarrollan gustos de amargor y astringencia.

En cuanto al olor y sabor, todos los lotes registraron puntuaciones similares durante los primeros días de conservación, entre 5 y 4 (típico y neutro) (Fig. 4). Sin embargo, después de 5 días, las puntuaciones se redujeron drásticamente, evolucionando a "amoniacal" o incluso "mal olor" y "mal sabor". El lote Ch10-PCc fue el único que mantuvo las puntuaciones por encima de 3 después de una semana de almacenamiento. Estos resultados guardan relación con los recuentos de microorganismos y producción de compuestos volátiles asociados al deterioro (Fig. 1B). Todos los lotes se rechazaron después de 10 días de conservación. (Fig. 4).

La melanosis evolucionó de manera similar en la cabeza y en el cuerpo del langostino (Fig. 4), aumentando progresivamente con el tiempo. Estos resultados son similares a los de Martínez-Álvarez *et al.*, (2005). Durante los primeros días, las puntuaciones fueron de 5 o similares. El control (C) y el lote LA registraron valores inferiores a 3 después de 5 días, momento en que la melanosis se consideró acusada, mientras que los lotes Ch10 y Ch10-PCc obtuvieron puntuaciones de 4-5 (ausencia). El mecanismo de desarrollo de melanosis se inicia por la acción enzimática de la polifenoloxidasa, que oxida los fenoles de los aminoácidos a quinonas. La polimerización posterior de las quinonas, incoloras, por un mecanismo no enzimático, da lugar a la acumulación de pigmentos negros de alto peso molecular (Ramírez, Whitaker, Virador, Voragen, y Wong, 2003), y el crustáceo se devalúa tras la aparición de puntos negros. Después de 7 días, el lote con cobertura Ch10-PCc registró puntuaciones de melanosis de 3,5 para la cabeza y 3 para el cuerpo, mientras que en el resto de los lotes las puntuaciones estuvieron por debajo de 2,5. En la literatura se ha descrito que el quitosano retrasa la aparición de manchas negras en los crustáceos, efecto que se atribuye a su acción quelante y a la barrera al oxígeno inducida por el recubrimiento que impide la actividad de la enzima PPO (Simpson *et al.*, 1997). En el presente trabajo este efecto se pudo observar hasta los 5 días de almacenamiento. Por el contrario, López- Caballero *et al.*, (2006) documentan que el quitosano no ejerció un efecto inhibitor significativo sobre la actividad de la PPO en langostinos. En el

Capítulo 5. Coberturas de quitosano enriquecidos con materiales activos de residuos de langostino para la conservación de langostinos

presente trabajo, el efecto del recubrimiento antimelanósico en base a quitosano para langostinos se reforzó por la incorporación del extracto lipoproteico.

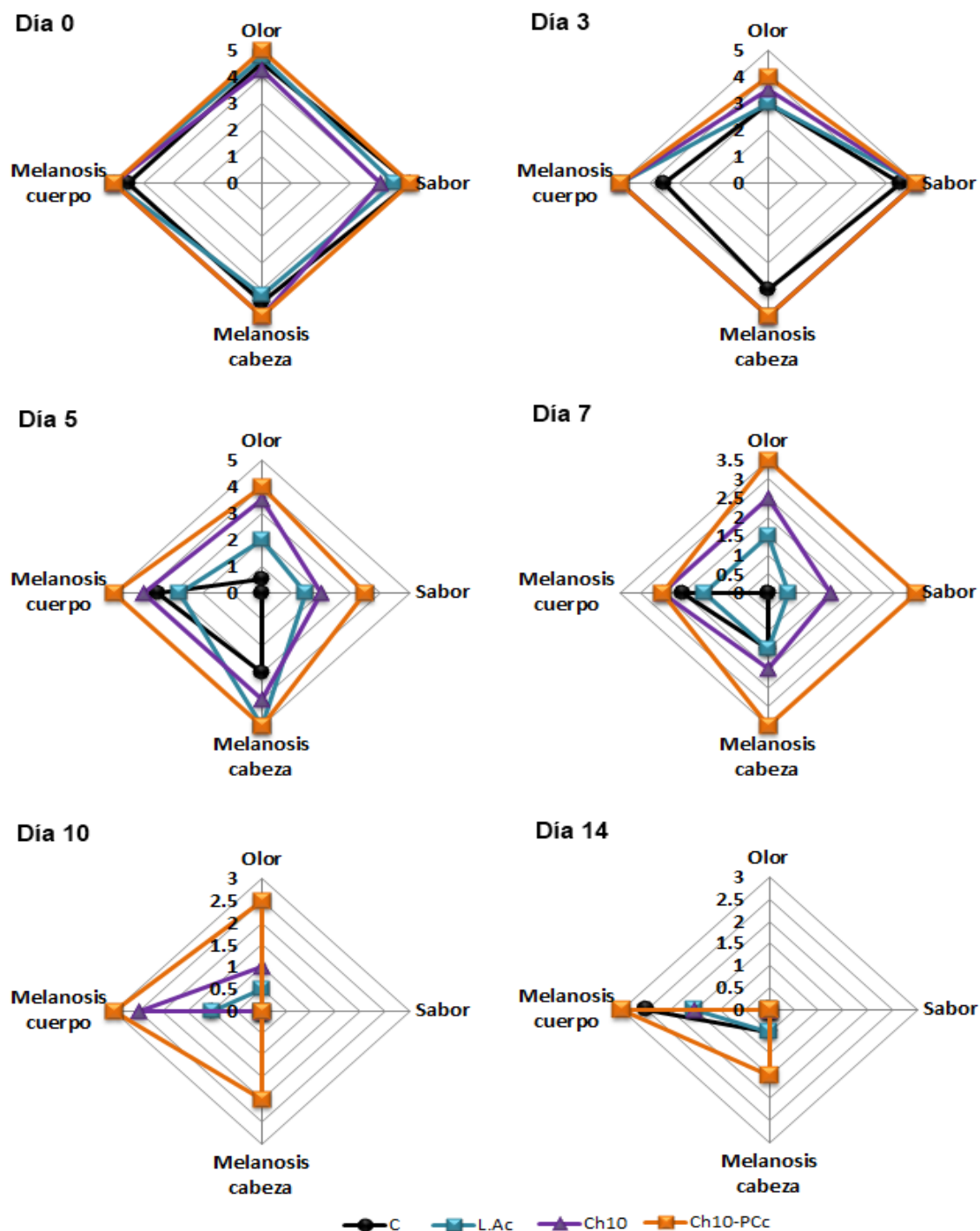


Figura 4. Evaluación sensorial de langostinos (*L. vannamei*), sin cobertura C: control, con cobertura de ácido láctico 0,15M (LA), quitosano (Ch10) y quitosano con extracto lipoproteico (Ch10-PCc) durante el almacenamiento a 4 °C durante 14 días.

Conclusiones

La cobertura activa de quitosano incorporada con un extracto lipoproteico aplicada a langostinos aumentó la fase de latencia e inhibió el crecimiento de los microorganismos implicados en el deterioro. Estos resultados estuvieron en consonancia con los índices bioquímicos. La cobertura de quitosano y extracto lipoproteico resultaron imperceptibles desde el punto de vista sensorial y previenen el desarrollo de manchas negras, por lo que podría ser una alternativa prometedora para preservar la calidad del langostino durante la conservación en refrigeración.

Bibliografía

- Aleman, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.
- Antonacopoulos, N., & Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: a third collaborative study by the West European Fish Technologists Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 189(4), 309-316.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717.
- Azmi, S., Srivastava, S., Mishra, N. N., Tripathi, J. K., Shukla, P. K., & Ghosh, J. K. (2013). Characterization of Antimicrobial, Cytotoxic, and Antidotoxin Properties of Short Peptides with Different Hydrophobic Amino Acids at "a" and "d" Positions of a Heptad Repeat Sequence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 924-939.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., & Kishimura, H. (2008). Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106(1), 185-193.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833-848.
- Casettari, L., Gennari, L., Angelino, D., Ninfali, P., & Castagnino, E. (2012). ORAC of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 243-247.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714.
- Dürr, U. H., Sudheendra, U., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1408-1425.
- Feng, Y., Han, Z., Peng, J., Lu, J., Xue, B., Li, L., Ma, H., & Wang, E. (2006). Fabrication and characterization of multilayer films based on Keggin-type polyoxometalate and chitosan. *Materials Letters*, 60(13-14), 1588-1593.
- Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J., & Ocio, M. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, 34(1), 61-68.
- Gonçalves, A. C., López-Caballero, M. E., & Nunes, M. L. (2003). Quality Changes of Deepwater Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Packed in Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, 68(8), 2586-2590.

- Guo, M., Jin, T. Z., Yang, R., Antenucci, R., Mills, B., Cassidy, J., Scullen, O. J., Sites, J. E., Rajkowski, K. T., & Sommers, C. H. (2013). Inactivation of natural microflora and inoculated *Listeria innocua* on whole raw shrimp by ozonated water, antimicrobial coatings, and cryogenic freezing. *Food Control*, 34(1), 24-30.
- Han, C., Lederer, C., McDaniel, M., & Zhao, Y. (2005). Sensory Evaluation of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*) Coated with Chitosan-based Edible Coatings. *Journal of Food Science*, 70(3), S172-S178.
- He, H., Chen, X., Sun, C., Zhang, Y., & Gao, P. (2006). Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology*, 97(3), 385-390.
- Huang, J., Chen, Q., Qiu, M., & Li, S. (2012). Chitosan-based edible coatings for quality preservation of postharvest whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science*, 77(4), 6.
- Jeon, Y.-J., Kamil, J. Y., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(18), 5167-5178.
- Kim, K. W., & Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101(1), 308-313.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.
- LeBlanc, R. J., & Gill, T. A. (1984). Ammonia as an Objective Quality Index in Squid. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17(4), 195-201.
- Lee, H.-W., Park, Y.-S., Jung, J.-S., & Shin, W.-S. (2002). Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe*, 8(6), 319-324.
- Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, 138(2–3), 821-826.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005a). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005b). A Functional Chitosan-Enriched Fish Sausage Treated by High Pressure. *Journal of Food Science*, 70(3), M166-M171.
- López-Caballero, M., Gonçalves, A., & Nunes, M. (2002). Effect of CO₂/O₂-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology*, 214(3), 192-197.
- López-Caballero, M., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(9), 1029-1038.
- López-Caballero, M., Martínez-Álvarez, O., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2006). Effect of natural compounds alternative to commercial antimelanotics on polyphenol oxidase activity and microbial growth in cultured prawns (*Marsupenaeus tiger*) during chilled storage. *European Food Research and Technology*, 223(1), 7-15.
- López-Caballero, M., Sánchez-Fernández, J., & Moral, A. (2001). Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained under different CO₂ and O₂ concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 277-287.
- Lu, F., Liu, D., Ye, X., Wei, Y., & Liu, F. (2009). Alginate–calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 °C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 848-854.

- Martínez-Álvarez, O., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2005). A 4-Hexylresorcinol-based Formulation to Prevent Melanosis and Microbial Growth in Chilled Tiger Prawns (*Marsupenaeus japonicus*) from Aquaculture. *Journal of Food Science*, 70(9), M415-M422.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, S. (1991). Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*(September), 80-86.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Nirmal, N., & Benjakul, S. (2009). Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(9), 3578-3586.
- Nirmal, N. P., & Benjakul, S. (2011). Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 247-253.
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, 72(5), R87-R100.
- No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 65-72.
- Nussinovitch, A. (2009). CHAPTER 10 - Biopolymer Films and Composite Coatings. In K. Stefan, T. N. Ian, I. T. N. Johan B. Ubbink - Stefan Kasapis & B. U. Johan (Eds.), *Modern Biopolymer Science* (pp. 295-326). San Diego: Academic Press.
- Nyström, B., Kjønksen, A.-L., & Iversen, C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(2-3), 81-103.
- Ojagh, S. M., Sahari, M., Rezaei, M., & Hosseini, S. V. (2011). Applicability of β -carotene and green tea polyphenols as two natural antioxidants in preservation of common killa (*Clupeonella cultriventris caspia*) with ice. *Int. J. Agric.: Res. Rev*, 1, 174-181.
- Ramirez, E., Whitaker, J., Virador, V., Voragen, A., & Wong, D. (2003). Handbook of food enzymology. In: Marcel Dekker, New York.
- Rosa, R., & Barracco, M. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr Surviv J*, 7, 262-284.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 73(1), 74-84.
- Sathivel, S. (2005). Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets During Frozen Storage. *Journal of Food Science*, 70(8), e455-e459.
- Senphan, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Characteristics and antioxidative activity of carotenoprotein from shells of Pacific white shrimp extracted using hepatopancreas proteases. *Food Bioscience*, 5, 54-63.
- Seymour, T. A., Li, S. J., & Morrissey, M. T. (1996). Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(3), 682-685.
- Simon, R. (1992). Pulmonary reactions to sulfites in foods. *Pediatric Allergy and Immunology*, 3(4), 218-221.
- Simpson, B., Gagne, N., Ashie, I., & Noroozi, E. (1997). Utilization of chitosan for b preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology*, 11(1), 25-44.
- Slinkard, K., y Singleton, V., (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

- UNE87-006-92. (1992). Prueba Triangular. In *Análisis sensorial. Metodología*. Madrid, Spain: Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR).
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.
- Wang, J. J., Lin, T., Li, J. B., Liao, C., Pan, Y. J., & Zhao, Y. (2014). Effect of acidic electrolyzed water ice on quality of shrimp in dark condition. *Food Control*, 35(1), 207-212.
- Wu, Y., Rhim, J. W., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S., & Schnepf, M. (2000). Moisture Loss and Lipid Oxidation for Precooked Beef Patties Stored in Edible Coatings and Films. *Journal of Food Science*, 65(2), 300-304.
- Yamada, K., Chen, T., Kumar, G., Vesnovsky, O., Topoleski, L. D. T., & Payne, G. F. (2000). Chitosan Based Water-Resistant Adhesive. Analogy to Mussel Glue. *Biomacromolecules*, 1(2), 252-258.

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

Resumen

En el presente trabajo se desarrollaron películas activas biodegradables (mono y bicapa), en base a agar y alginato de sodio, con la incorporación de aceite esencial de canela. Los langostinos cocidos pelados y recubiertos con las películas monocapa presentaron un sabor muy fuerte procedente del aceite esencial de canela, por lo que se descartaron. La liberación de cinamaldehído y eugenol de las películas en bicapa de agar y de alginato en agua fue máxima al cabo de 9 horas a 4 °C y 20 °C, y como consecuencia, los valores de actividad antioxidante (medida por la capacidad de reducción del hierro y la capacidad para secuestrar radicales libres), se observó a las 9 h, tanto en las películas de agar como en las de alginato. Además, la liberación de cinamaldehído y de eugenol disminuyó ligeramente desde las 24 a las 72 h, probablemente debido a la volatilidad del aceite y de sus componentes. Las películas en bicapa de agar mostraron una actividad antimicrobiana aproximadamente 1,4 veces mayor que las películas en bicapa de alginato. Sin embargo, ambas fueron eficaces frente a todos los microorganismos utilizados en este estudio, especialmente *P. phosphoreum*. Tanto las películas en bicapa de agar como de alginato redujeron de manera significativa el crecimiento microbiano, incluso de *Listeria monocytogenes*, en langostinos pelados y cocidos durante la conservación en refrigeración.

Palabras clave: Agar, alginato, películas en bicapa, canela, antioxidante, antimicrobiano.

Introducción

Hoy en día existe un interés cada vez mayor por encontrar materiales biodegradables para el envasado, que se asocia directamente a los inconvenientes ambientales producidos por los plásticos de origen petroquímico no biodegradables. Los biopolímeros, sin embargo, se obtienen a partir de material de residuo o de fuentes renovables, que incluyen principalmente polisacáridos de origen natural y proteínas de origen vegetal y animal, así como aquellos sintetizados químicamente a partir de monómeros de origen natural, como el ácido láctico (Bordes, Pollet, y Avérous, 2009). En cuanto a los polisacáridos, su gran variedad de estructuras permite obtener películas con una amplia gama de propiedades. El agar y el alginato son polisacáridos extraídos de algas marinas con buenas propiedades para la formación de películas.

Además de su alta resistencia mecánica y moderada resistencia al agua, el agar es una buena matriz para obtener películas activas biodegradables que permite la liberación de compuestos

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

antioxidantes y antimicrobianos cuando se incorporan a las películas (Giménez, López de Lacey, Pérez-Santín, López-Caballero, y Montero, 2013). El alginato tiene la capacidad de reaccionar con cationes metálicos polivalentes para producir geles fuertes y reducir la permeabilidad al vapor de agua de las películas, haciéndolas más insolubles al agua (Pavlath, Gosset, Camirand, y Roberton, 1999). Esta propiedad de reticulación permite que el alginato se utilice, por ejemplo, como matriz para la liberación controlada de fármacos (Wang, Hu, Du, y Kennedy, 2010).

La incorporación de aceites esenciales en matrices poliméricas con el fin de conferir propiedades antimicrobianas y antioxidantes ha sido ampliamente estudiada. Entre ellos, el aceite esencial de canela (AE) ha demostrado una gran actividad antimicrobiana y de amplio espectro (Chao, Young, y Oberg, 2000). El uso de películas biodegradables con AE es una tecnología prometedora en la conservación de pescado y carne, que ha sido objeto de estudio en los últimos años. Por ejemplo, el AE de canela se ha incorporado en recubrimientos de alginato de calcio y de quitosano, para mantener la calidad de filetes de pescado cabeza de serpiente del norte (*Channa argus*) y filetes de trucha (Lu, Ding, Ye, y Liu, 2010; Ojagh, Rezaei, Razavi, y Hosseini, 2010). Sin embargo, la principal limitación para el uso de AE en la conservación de alimentos es la persistencia de un aroma fuerte que puede afectar a las propiedades organolépticas de los alimentos (Sánchez-González, Vargas, González-Martínez, Chiralt, y Cháfer, 2011).

El término película en bicapa se ha definido como dos capas de hidrocoloide moldeadas una sobre la otra (Rivero, García, y Pinotti, 2009). Según estos autores, las películas bicapa de quitosano-gelatina presentaron mejores propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua que las correspondientes películas compuestas. Además, Thu, Zulfakar, y Ng, (2012) observaron que las películas en bicapa de hidrocoloides en base a alginato pueden utilizarse para la liberación lenta de compuestos que son efectivos para la cicatrización de heridas, en el que la capa inferior libre de compuesto activo actúa como una membrana que controla la velocidad de liberación. Por otra parte, el uso de películas poliméricas en bicapa permite la incorporación de aceites esenciales en dosis eficaces, lo que podría reducir las repercusiones sensoriales negativas si el AE se añade en la capa superior.

El objetivo de este estudio fue desarrollar películas monocapa y bicapa en base a alginato y agar con AE de canela y analizar los efectos de las diferentes técnicas de preparación de las películas en las propiedades sensoriales de langostinos cocidos y pelados. Además, se evaluó la liberación de compuestos antioxidantes y antimicrobianos desde las matrices poliméricas en

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

bicapa de agar y de alginato, así como el efecto antimicrobiano de estas películas sobre langostinos cocidos y pelados.

Materiales y métodos

Preparación de las películas en monocapa y bicapa

Para la preparación de las películas monocapa, el agar (Goldagar, Hispanagar, Burgos, España) y el alginato de sodio (Manuel Riesgo, Madrid, España) se disolvieron en agua destilada (1% p/v) a 90 °C y 70 °C, respectivamente. El aceite de Canela (Isabrubotanik, Ambato, Ecuador) se añadió en una proporción del 1% (p/p) y se utilizó glicerol como plastificante (1% p/p). En el caso de las películas de alginato, la reticulación del polímero fue inducida con la adición de CaCl_2 (Panreac, Barcelona, España) a la solución filmogénica (7% p/p de alginato de sodio) con el fin de generar películas insolubles. Las soluciones precursoras de películas se sometieron a ultrasonidos (Q700, Qsonica, CT, EE.UU.) con una amplitud del 100% durante 1 minuto. Posteriormente las soluciones (50 g) se colocaron sobre placas de metacrilato (12 cm x 12 cm) y se secaron a 45 °C durante 12 h. Previa realización de los análisis, las películas se acondicionaron a 20 °C con 58% de humedad relativa (HR) durante 48 h.

Para la preparación de las películas en bicapa, el aceite esencial se incorporó únicamente en la capa superior. Para la capa inferior, cada biopolímero se disolvió en agua destilada, tal como se describió anteriormente (1% p/v). El glicerol se utilizó como plastificante (1% p/p solución filmogénica). Como en el caso de la monocapa de alginato, la reticulación del polímero fue inducida con la adición de CaCl_2 (7% p/p de alginato de sodio) en la solución filmogénica, con el objetivo de generar películas insolubles. Las mezclas se agitaron y una vez homogenizadas se colocó 25 g de la solución filmogénica en placas de metacrilato (12 cm x 12 cm), que posteriormente se secaron a 45 °C durante 12 h. El método de preparación de la capa superior fue similar al de la capa inferior, si bien en este caso se incorporó AE de canela al 2% (p/p solución filmogénica) y glicerol al 0,5% (p/p solución filmogénica) como plastificante. Ambas soluciones se sometieron a ultrasonidos al 100% de amplitud durante 1 min. Finalmente la solución (25 g) se vertió sobre la capa inferior y se secaron a 45 °C durante 12 h. Antes de realizar los respectivos análisis, las películas se acondicionaron a 20 °C con 58% de humedad relativa (HR) durante 48 horas. Además, se prepararon películas bicapa de agar y alginato de sodio sin la incorporación de aceite esencial de canela siguiendo la metodología anterior. Las películas bicapa sin aceite esencial de canela se utilizaron como control durante la evaluación del efecto antimicrobiano.

Análisis sensorial

Se realizó mediante una prueba triangular (UNE 87 006 92) para comprobar las diferencias entre la aplicación de películas, mono o bicapa, con aceite de canela. Los langostinos crudos y pelados se recubrieron con las películas y se conservaron a 4 °C durante 3 días. Diez panelistas semi-entrenados probaron, previa retirada de las películas, los langostinos cocidos, siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE. Además los panelistas evaluaron el olor y sabor del langostino de acuerdo con una escala de 0 a 5, donde 0 = típico, característico y 5 = no característico, extraño.

Liberación en agua de cinamaldehído y eugenol

La liberación de cinamaldehído y de eugenol de las películas bicapa de agar y alginato con aceite esencial de canela se determinó durante 72 h en agua, que se considera como un simulador de un alimento acuoso por la legislación europea, tanto a temperatura ambiente (20 °C) como a temperatura de almacenamiento en estado refrigerado (4 °C). Las porciones de las películas bicapa de agar y de alginato de sodio (9 cm²) se colocaron en vasos de precipitados con 15 mL de agua destilada y la fracción de película no disuelta se retiró del agua a distintos intervalos de tiempo. La solución restante se filtró a través de un papel filtro Whatman N °1 y se utilizó para analizar el contenido de cinamaldehído y eugenol liberado de las películas bicapa, así como para evaluar la capacidad antioxidante.

La cantidad de cinamaldehído y eugenol liberada de las películas después de 0,25, 9, 24 y 72 h en agua a 4 °C y 20 °C, se cuantificó mediante cromatografía GC-MS con un sistema Agilent que comprende un cromatógrafo de gases 6890N con un inyector automatizado integrado (Agilent 7683) y un puerto de inyección “split/splitless” acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 (Agilent Technologies, EE.UU.).

Las muestras acuosas se diluyeron con hexano (1:100) y se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 5 minutos. Después de la separación de fases, se añadieron 10 µl del estándar interno (2-octanona en hexano) a 500 µl de la fase orgánica. El volumen de inyección fue de 0,2 µl. La separación cromatográfica se realizó con una columna HP-5MS (30 mx 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor, Agilent Technologies, EE.UU.). La inyección se realizó a 230 °C. Se utilizó helio como gas portador, con un flujo constante de 1 mL/min. El intervalo de temperaturas para el horno fue el siguiente: temperatura inicial 40 °C durante 5 min, posteriormente se aumentó hasta 160 °C a una velocidad de 8 °C/min y finalmente se incrementó hasta 220 °C a razón de 20 °C/min durante 3 min. Se utilizó el modo de ionización

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

de impacto electrónico (EI) con filtro de masas de cuadrupolo. La energía de ionización fue de 70 eV y la línea de transferencia fue de 230 °C. La cuantificación, sin embargo, se llevó a cabo en seguimiento de iones seleccionados (**SIM**) para 2-octanona, cinamaldehído y eugenol. Los resultados se expresaron como mg de cinamaldehído por g de película y mg de eugenol por g de película, basados en una curva estándar de cinamaldehído y eugenol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Actividad antioxidante de las películas en bicapa

La actividad antioxidante de las películas bicapa de agar y alginato de sodio durante 72 h en agua a 4 °C y 20 °C se evaluó con los métodos de FRAP y ABTS. La capacidad de captación del radical **ABTS** [2, 2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), Sigma-Aldrich] liberada después de 0,25; 0,5; 0,75; 1,5; 3; 6; 9; 24; 36; 48 y 72 h se determinó de acuerdo con una versión modificada del método de Re *et al.*, (1999). Los resultados se expresaron como mg de Vitamina C Equivalente (VCEAC) por g de película a partir de la curva estándar de vitamina C (Sigma-Aldrich), que relaciona la concentración de vitamina C con la reducción de la absorbancia causada por la vitamina C. Todos los valores se determinaron al menos por triplicado.

El ensayo de FRAP (capacidad del plasma para reducir iones férricos) es una medida de la capacidad reductora de las muestras y se realizó de acuerdo al método descrito por Pulido, Bravo y Saura-Calixto (2000). 30 µL de las soluciones después de 0,25; 0,5; 0,75; 1,5; 3; 6; 9; 24; 36; 48 y 72 h de liberación en agua se incubaron (37 °C) con 90 µL de agua destilada y 900 µL de reactivo FRAP que contiene TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina, Sigma-Aldrich) y FeCl₃ (Sigma, Aldrich). Los valores de absorbancia se leyeron a 595 nm después de 30 min de incubación. Los resultados se expresaron como µmol equivalentes de FeSO₄•7H₂O/g de película basada en una curva estándar de FeSO₄•7H₂O (Sigma, Aldrich), que relaciona la concentración de FeSO₄•7H₂O (µM) con la absorbancia a 595 nm. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Actividad antimicrobiana de las películas en bicapa

La actividad antimicrobiana de las películas con AE se evaluó por el método de difusión en disco en placa de agar frente a 8 microorganismos de la Colección de Cultivos Tipo Español (CECT), seleccionados por su importancia en la salud humana (ya sean bacterias lácticas o

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

patógenas) y por ser responsables del deterioro de los alimentos: *Escherichia coli* CECT 515, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T.

De cada una de las películas se obtuvieron asépticamente discos de 10 mm de diámetro, que se colocaron en placas de agar previamente sembradas con el microorganismo correspondiente (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010). La actividad antimicrobiana cuantitativa se determinó midiendo el diámetro de inhibición alrededor del disco de la película (que se consideró como actividad antimicrobiana) usando el software X3 Corel Photo-Paint. Los resultados se expresaron como el diámetro de inhibición del crecimiento (mm). Cada determinación se realizó por duplicado.

Efecto antimicrobiano de las películas en bicapa en langostinos pelados

Para determinar el efecto antimicrobiano de las películas bicapa durante la conservación, los langostinos crudos y pelados se inocularon con *L. monocytogenes* (CECT 4032), en una concentración de 10^3 - 10^4 UFC/g. y se recubrieron con las películas bicapa de agar y alginato con AE de canela (A y AL, respectivamente) y sin AE (CA, CAL); las muestras sin película se utilizaron como control (C). Los lotes se colocaron en bolsas de polietileno (Cofresco®, Minden, Alemania) y se conservaron a 5 °C durante 20 días. Para los análisis microbiológicos, se pesaron 10 g de langostinos crudos y pelados, se transfirieron a bolsas estériles (Sterilin, Stone, Staffordshire, Reino Unido) con 90 mL de solución de agua de peptona 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se agitaron vigorosamente durante 1 min en un homogeneizador Stomacher (modelo Colworth 400, Seward, Londres, Reino Unido). A continuación se prepararon las diluciones apropiadas para las siguientes determinaciones de microorganismos: (i) recuentos de bacterias totales (TBC) en placas de Agar Hierro (Scharlab, Barcelona, España) con 1% de NaCl, incubados a 15 °C durante 3 días, (ii) organismos productores de H₂S, como colonias negras, en placas Agar Hierro incubadas a 15 °C durante 3 días, (iii) bacterias luminiscentes en placas de Agar Hierro con 1 % NaCl incubadas a 15 °C durante 5 días, (iv) organismos mesófilos aerobios viables en placas agar para recuento en placa, PCA (Oxoid) incubadas a 30 °C durante 72 h, (v) *L. monocytogenes* en agar cromogénico chromID™ (BioMerieux, Madrid, España) para la enumeración de *L. monocytogenes* incubaron durante 24 horas a 37 °C y confirmados por Lmono Rapidec® (BioMerieux). Todos los recuentos microbiológicos se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

gramo de muestra (log UFC/g). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El día de la inoculación de los langostinos con listeria se consideró como día cero (0).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS (SPSS Statistical Software Inc., Chicago, IL, EE.UU.) con un análisis de varianza de una vía. Las diferencias entre medias a través de los intervalos de confianza se evaluaron mediante la prueba de Tukey-b. El nivel de significancia fue de $p \leq 0,05$.

Resultados y discusión

Análisis sensorial

El análisis sensorial reveló que los langostinos cocidos recubiertos con las películas monocapa con AE se percibieron como diferentes de los recubiertos con la bicapa por el 100% de los panelistas. Los langostinos recubiertos con las películas monocapa mostraron un sabor y olor pronunciado a canela calificado por los panelistas con 4,5 en ambos casos ($p \leq 0,05$) ya que el AE estuvo en contacto directo con las muestras. Por esta razón, se seleccionaron las películas bicapa de agar y de alginato con canela, que obtuvieron puntuaciones <1 en sabor y de 0,5 en olor, con el fin de evaluar la liberación de compuestos antioxidantes y antimicrobianos en agua y su efecto antimicrobiano en langostino crudo pelado.

Liberación de cinamaldehído y eugenol en agua

Si bien el cinamaldehído, componente mayoritario del AE de canela, es ampliamente conocido por sus propiedades antimicrobianas, algunos estudios han documentado que posee una significativa actividad antioxidante en varios modelos alimentarios. El eugenol es también un potente antioxidante presente en el AE de canela (El-Baroty, Abd El-Baky, Farag, y Saleh, 2010). La liberación de estos compuestos en agua, desde las películas bicapa de agar y de alginato, se controló a 4 °C y 20 °C durante 72 h. La liberación de cinamaldehído alcanzó el pico máximo después de 9 h en ambas películas (Figura 1A), y no se observó un incremento notable después de 9 h ($p \geq 0,05$). Por otra parte, se observó una ligera disminución en la liberación de cinamaldehído entre las 24 h y 72 h, probablemente debido a la gran volatilidad de este compuesto. La cantidad de cinamaldehído liberado en agua a las 0,25 h (en ambas temperaturas) fue superior ($p \leq 0,05$), en las películas de agar que en las de alginato (probablemente por una leve interacción entre el AE y la matriz de alginato), igualándose la

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

cantidad liberada en las dos películas en tiempos sucesivos ($p \geq 0,05$). La temperatura no afectó la liberación de cinamaldehído, y no se encontraron diferencias consistentes entre temperaturas (4 °C ó 20 °C).

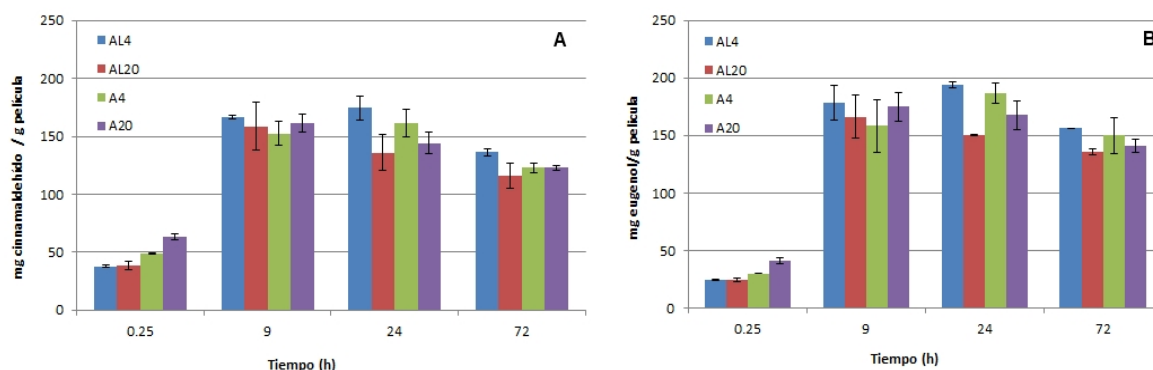


Figura 1. Liberación de: A) cinamaldehído y B) eugenol desde las diferentes matrices incorporadas con aceite esencial de canela en función del tiempo., película bicapa de alginato a 4 °C (AL4) y 20 °C (AL20); película bicapa de agar a 4 °C (A4) y 20 °C (A20).

En cuanto al eugenol, la liberación de este compuesto fenólico alcanzó el máximo a las 9 h en ambas películas, tanto a 4 °C como a 20 °C (Figura 1B), y no se observó un aumento notable en la concentración después de las 9 h ($p \geq 0,05$). Entre las 24 y 72 h se apreció una ligera disminución en la liberación de eugenol, probablemente debido a su volatilidad. Tal como se describe para el cinamaldehído, no se encontraron diferencias consistentes en la liberación de eugenol entre las películas de agar o alginato. Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca y Montero (2012) estudiaron la liberación de eugenol en agua a partir de películas de gelatina con AE de clavo durante 16 h. Estos autores demostraron que la liberación de eugenol en agua alcanzó el máximo después de 45 min., sin un aumento notable a partir de este tiempo. Sin embargo, en el presente estudio se observó un aumento más lento y gradual en la liberación de eugenol en las películas de agar y de alginato hasta las 9 h. En la liberación de compuestos activos desde las matrices poliméricas influyen principalmente las propiedades del polímero y del compuesto activo, así como de sus interacciones (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010) y las características del producto alimenticio (López de Dicastillo, Nerín, Alfaro, Catalá, Gavara, y Hernández-Muñoz, 2011).

Actividad antioxidante de las películas bicapa

La actividad antioxidante liberada de las películas de agar y de alginato se controló durante 72 h a través de los ensayos de FRAP y ABTS. En ambas películas se observó un aumento de los valores de FRAP (Figura 2A) y de ABTS (Figura 2B) con el tiempo, lo que demuestra claramente el aumento de la liberación de los compuestos antioxidantes. La actividad antioxidante de estas películas guarda relación con la liberación de cinamaldehído y eugenol a 4 °C y a 20 °C (Figura 1 Ay 1B). Así la actividad antioxidante aumentó gradualmente con el tiempo alcanzando el máximo después de 9 h y no se observó un aumento considerable después de las 9 h ($p \geq 0,05$). Además, durante el tiempo de ensayo (72 h) no se encontraron diferencias entre el poder reductor ni la capacidad de captación de radicales, tanto en las películas de agar como de alginato. La actividad antioxidante no se vio afectada por la temperatura a la se realizó el ensayo (4 y 20 °C). El AE de canela posee una alta actividad antioxidante, similar a la de los antioxidantes sintéticos tales como BHT o BHA (El-Baroty *et al.*, 2010). Se ha descrito que el eugenol es el principal componente responsable de la capacidad de captación de radicales del AE de la corteza de canela, demostrando una capacidad de captación de radicales DPPH mucho más alta que el cinamaldehído (Lin, Yu, Wu, y Yih, 2009). En la literatura se han encontrado varios estudios sobre la incorporación de AE de canela en películas. Si bien la mayor parte de ellos se centran en las propiedades antimicrobianas de la canela y las propiedades de las películas obtenidas (Ojagh *et al.*, 2010; Atarés, Bonilla, y Chiralt, 2010b), muy pocos evalúan su actividad antioxidante (Salmieri y Lacroix, 2006). Salmieri y Lacroix (2006) observaron que la adición de AE de canela en películas de alginato y policaprolactona aumentó significativamente las propiedades anti-radical de las películas en comparación con el control. Sin embargo, las películas con AE de canela mostraron menor actividad anti-radical que las de orégano, probablemente debido al menor contenido de eugenol, carvacrol o timol.

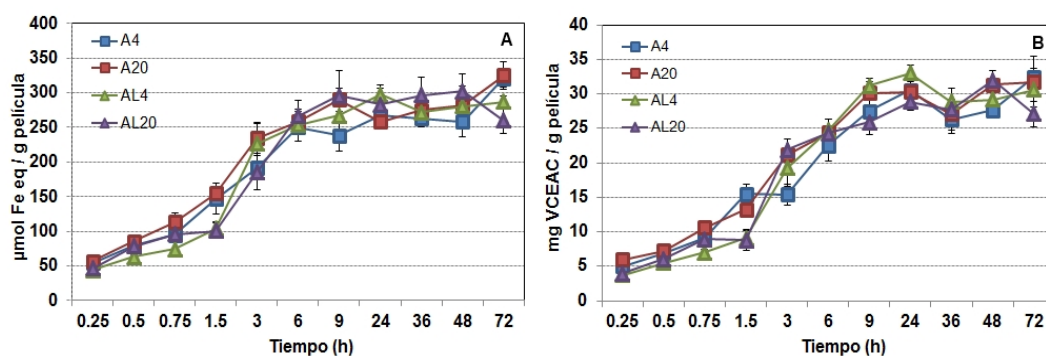


Figura 2. Actividad antioxidante liberada de las películas en función del tiempo, medida por A) FRAP y B) ABTS en, películas bicapa de alginato a 4 °C (AL4) y 20 °C (AL20); y películas bicapa de agar a 4 °C (A4) y 20 °C (A20).

Actividad antimicrobiana de las películas bicapa

Las películas en bicapa con AE canela mostraron actividad antimicrobiana frente a varios microorganismos (Tabla 1). *P. phosphoreum* fue el más sensible, seguido por *V. parahaemolyticus*. Mejlholm y Dalgaard (2002) evaluaron el efecto antimicrobiano de nueve aceites esenciales en medios líquidos, incluyendo AE de canela, frente *P. phosphoreum* y observaron un porcentaje de inhibición mayor al 85% con sólo 0,01% v/v de concentración. Del mismo modo, Nanasombat y Wimuttigol (2011) observaron que el AE de canela fue muy eficaz frente a *E. coli*, *P. fluorescens*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela está relacionada con la concentración, así como con el tipo y la proporción de compuestos fenólicos, aunque su composición depende de diferentes factores, tales como la variedad de la planta, el origen, el tiempo de cosecha, el procesamiento y almacenamiento (Ncube, Afolayan, y Okoh, 2008 ; Bakkali, Averbeck, Averbeck, y Idaomar, 2008). El trans-cinamaldehído y el eugenol son unos de los principales componentes del AE de canela (El-Baroty *et al.*, 2010), y son también unos de los principales constituyentes del AE utilizado en este estudio. Gill y Holley (2004) demostraron que el eugenol y el cinamaldehído poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias, tanto Gram-positivas como para Gram-negativas, lo que guarda relación con los resultados del presente estudio (Tabla 1). El efecto antimicrobiano del AE de canela se ha descrito, tanto como aceite esencial (Lu *et al.*, 2010; Ojagh *et al.*, 2010), como incorporado en películas de quitosano, alginato o proteína de aislado de soja (Ojagh *et al.*, 2010; Atarés, De Jesús, Talens, y Chiralt, 2010a; Lu *et al.*, 2010).

Aunque el mecanismo de acción del AE canela no ha sido claramente dilucidado, se podría atribuir a daño celular, inactivación de enzimas y destrucción de material genético (Oussalah, Caillet, y Lacorix, 2006; Wendakoon y Sakaguchi, 1995). Wendakoon y Sakaguchi (1995) observaron que el grupo hidroxilo del eugenol puede unirse a las proteínas e impedir la actividad enzimática de *Enterobacter aerogenes*, mientras que el cinamaldehído inhibe la actividad de la enzima descarboxilasa. Además, Gill y Holley (2006) observaron que el eugenol y el cinamaldehído inhiben la actividad de la ATPasa de la membrana de *E. coli* y *L. monocytogenes*. Los resultados del presente experimento muestran que *L. monocytogenes* (Gram-positiva) fue más sensible al aceite esencial que *E. coli* (Gram negativa) (Tabla 1). Estos resultados se pueden atribuir a la presencia de lipopolisacáridos en la pared celular de las bacterias Gram-negativas, que las hace más resistentes (Gómez-Estaca *et al.*, 2010).

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

Tabla 1. Actividad antimicrobiana cuantitativa (mm) de las películas bicapa de alginato y agar incorporadas con aceite esencial de canela.

Microorganismo	Alginato	Agar
<i>Escherichia coli</i>	196,5 ± 0,71b,c,d/x	297,0 ± 19,80b/y
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	457,5 ± 54,44a/x	527,0 ± 22,63a/y
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	189,5 ± 0,71b,d/x	266,5 ± 12,02b/y
<i>Salmonella cholerasuis</i>	198,5 ± 2,12b,c,e/x	313,5 ± 2,12b/y
<i>Shewanella putrefaciens</i>	233,5 ± 2,12b,e/x	291,0 ± 16,97b/x
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	270,5 ± 12,02c,e/x	324,5 ± 7,78b/x
<i>Listeria monocytogenes</i>	237,5 ± 2,12d,e/x	321,0 ± 21,21b/y
<i>Staphylococcus aureus</i>	192,5 ± 4,95b,c,d/x	286,5 ± 19,10b/y

Diferentes letras (a,b,c,d,e) en la misma columna indican diferencias significativas entre microorganismos en la misma matriz polimérica. Diferentes letras (x, y, z) en la misma fila indican diferencias significativas entre matrices para el mismo microorganismo. Los resultados son la media ± desviación estándar.

También se encontraron algunas diferencias en la actividad antimicrobiana en función de la matriz utilizada para la incorporación del AE de canela ($p \leq 0,05$). La actividad antimicrobiana en las películas de agar fue aproximadamente 1,4 veces mayor que en las películas de alginato de sodio. Este hecho se debe probablemente al efecto de la alta reticulación del alginato, producto de la adición de CaCl_2 para formar la denominada estructura de "caja de huevos" (Yang, Campanella, Hamaker, Zhang, y Gu, 2013) o también a las posibles interacciones entre los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos y la cadena polimérica de alginato (Plazinski y Plazinska, 2011). En el presente estudio, los resultados indican que las películas bicapa, incorporadas con AE canela (2% p/p) en la capa superior, permiten la liberación de compuestos antimicrobianos a partir de la matriz polimérica y son efectivas frente a los microorganismos seleccionados.

Efecto antimicrobiano de las películas bicapa aplicadas sobre langostinos crudos pelados

El efecto antimicrobiano del AE de canela fue evidente durante la conservación de langostinos (Figuras 3 y 4). Inicialmente, los recuentos de *L. monocytogenes* fueron de 3,9 log UFC/g en todos los lotes (Figura 3). Durante el ensayo, los recuentos de listeria aumentaron hasta casi llegar a 8,0 UFC/g a los 7 días tanto en el control (C, langostinos sin cubrir) como en los lotes cubiertos con las películas sin AE de canela de agar y de alginato (CA y ALC, respectivamente). Sin embargo, en las películas bicapa de agar y de alginato con AE de canela (A y AL, respectivamente) inhiben más de 2 ciclos logarítmicos los recuentos de este microorganismo (Figura 3).

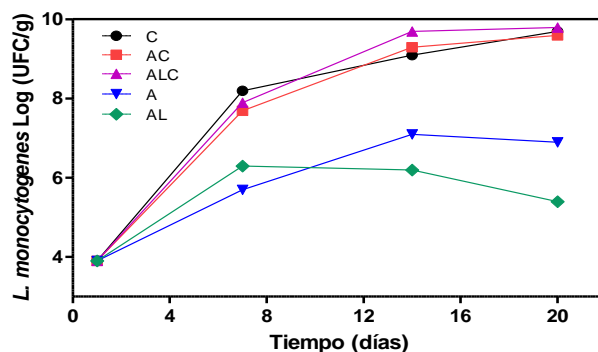


Figura 3. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en langostinos crudos pelados durante la conservación en estado refrigerado. Langostinos control, sin cubrir (C), langostinos cubiertos con películas bicapa de agar y alginato sin AE de canela (AC y ALC, respectivamente), langostinos cubiertos con películas bicapa de agar y alginato con AE (A y AL, respectivamente).

La tasa de crecimiento fue más rápida para listeria en los lotes sin AE de canela, alcanzando ~10 log UFC/g a los 20 días. Algunos investigadores describen un importante efecto inhibitorio del extracto de canela (corteza de Cassia) contra bacterias patógenas y alterantes en carne de cerdo fresca envasada en atmósfera controlada y en rebanadas de jamón envasadas al vacío (Zhang, Kong, Xiong, y Sun, 2009).

Los recuentos de bacterias totales siguieron una tendencia similar en las muestras sin AE durante la conservación (Figura 4A). Sin embargo, las películas bicapa con canela redujeron el crecimiento de los microorganismos totales cerca de 2 o 4 ciclos logarítmicos (matrices de agar y alginato, respectivamente) al final del período estudiado. En el caso de los microorganismos mesófilos aerobios totales se obtuvieron resultados similares (Figura 4B). Si bien al principio de la conservación no se detectaron colonias luminiscentes, posteriormente, se observó una reducción en el número de presuntos *P. phosphoreum* a los 7 días, en los lotes A y AL (Figura 4C). La sensibilidad de este microorganismo al AE de canela se ha descrito anteriormente (Mejlholm y Dalgaard, 2002). La presencia de las películas bicapa inhibe el crecimiento de microorganismos productores de H_2S (principalmente *S. putrefaciens*) durante los primeros días (Figura 4D). De forma similar a las colonias luminiscentes, los microorganismos productores de H_2S mostraron una disminución en los recuentos (entre 2-3 ciclos log) en los langostinos cubiertos con películas bicapa de alginato incorporados con AE canela (Figura 4D).

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

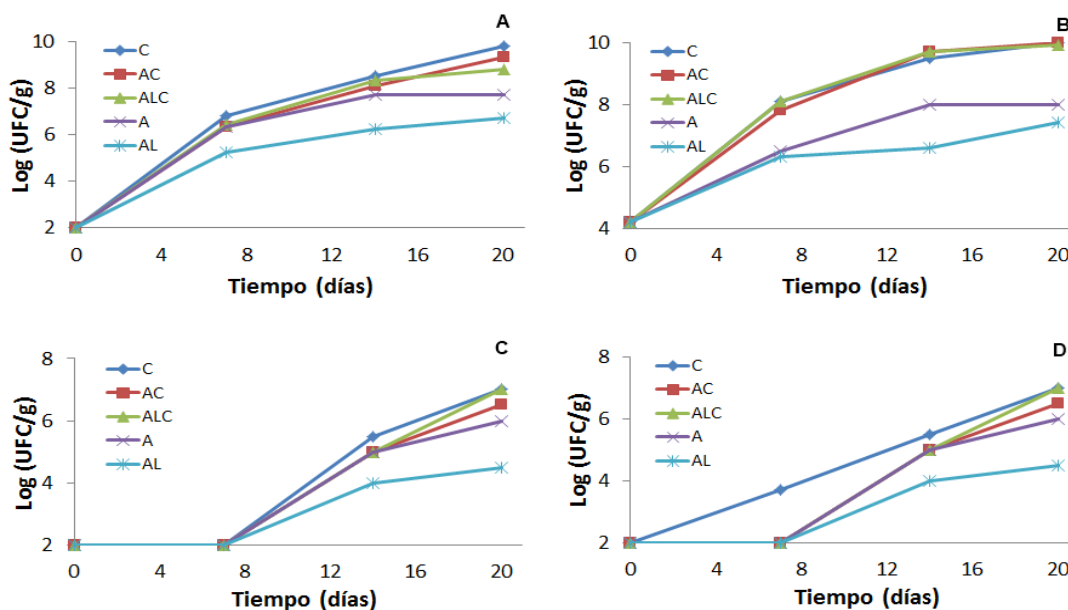


Figura 4. Recuentos de bacterias totales (4A), mesófilos aerobios viables (4B), bacterias luminiscentes (4C) y microorganismos productores de H₂S (4D) en langostinos crudos almacenados en estado refrigerado. Langostinos descubiertos (C), muestras cubiertas por películas bicapa de agar y alginato sin AE de canela (AC y ALC respectivamente), muestras cubiertas por películas bicapa de agar y alginato con AE (A y AL respectivamente).

Los resultados del presente experimento concuerdan con los obtenidos por (Lu *et al.*, 2010) durante la conservación en estado refrigerado de filetes *de* cabeza de serpiente previamente sumergidos en una solución de alginato y AE de canela. Sin embargo en el presente trabajo con dosis inferiores (3 veces) a las utilizadas por (Lu *et al.*, 2010), las películas bicapa de alginato con AE de canela permiten la liberación gradual de los agentes antimicrobianos e inhiben el crecimiento de microorganismos; esta actividad se mantuvo durante todo el período de conservación y contribuyó a extender la vida útil de los langostinos crudos y pelados.

Conclusiones

Las películas bicapa de agar y de alginato incorporadas con aceite esencial de canela proporcionan propiedades antioxidantes y antimicrobianas y disminuyen la percepción del aceite esencial cuando se aplican sobre langostinos cocidos y pelados en comparación con películas monocapa. Las películas bicapa de agar y de alginato permiten la liberación gradual en agua de compuestos activos (cinamaldehído y eugenol) y reducen significativamente el crecimiento microbiano, incluso de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, en langostinos crudos y pelados durante la conservación en estado refrigerado.

Bibliografía

- Atarés, L., De Jesús, C., Talens, P., & Chiralt, A. (2010a). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 384-391.
- Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010b). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bordes, P., Pollet, E., & Avérous, L. (2009). Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. *Progress in Polymer Science*, 34, 125-155.
- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639-649.
- El-Baroty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S., & Saleh, M. A. (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African journal of Biochemistry Research*, 4(6), 167-174.
- Fei, L., Yuting, D., Xingqian, Y., & Donghong, L. (2010). Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1331-1335.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750-5755.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 170-174.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar–gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 264-271.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- Helander, I. M., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Hosseini, M. H., Razavi, S. H., & Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 727-743.
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., & Tadini, C. C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1088-1094.
- Kramer, R. E. (1985). Antioxidants in clove. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 62, 111-113.

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

- Lin, C., Yu, C., Wu, S., & Yih, K. (2009). DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(5), 386-395.
- López-de-Dicastillo, C., Nerín, C., Alfaro, A., Catalá, R., Gava, R., & Hernández-Muñoz, P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7832-7840.
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X., & Liu, D. (2010). Cinnamon and nisin in alginate calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1331-1335.
- Mahmoud, B., Yamazaki, K., Miyashita, K., Il-Shik, S., Dong-Suk, C., and Suzuki, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21(6), 657-666.
- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31.
- Nanasombat S., & Wimuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.
- Ncube, N.S., Afolayan, A.J., and Okoh, A.I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797-1806.
- Ojagh, S., Rezaei, M., Razavi, S., and Hosseini, S. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193-198.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., & Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006a). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244.
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006b). Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1046-1055.
- Pavlath, A. E., Gosset, C., Camirand, W., & Robertson, G. H. (1999). Ionomeric films of alginic acid. *Journal of Food Science*, 64, 61-63.
- Plazinski, W., & Plazinska, A. (2011). Molecular dynamics study of the interactions between phenolic compounds and alginate/alginic acid chains. *New Journal of Chemistry*, 35, 1607-1614.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rivero, S., García, M., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of food engineering*, 90(4), 531-539.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., & McHugh, T. H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 634-641.

Capítulo 6. Liberación de aceite esencial de canela de matrices poliméricas y su potencial aplicación durante la inhibición del crecimiento microbiano en langostinos crudos y pelados

- Salmieri, S., & Lacroix, M. (2006). Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10205-10214.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118-122.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71-78.
- Thu, H.-E., Zulfakar, M. H., & Ng, S.-F. (2012). Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International journal of pharmaceutics*, 434(1), 375-383.
- UNE87-006-92. (1992). Prueba Triangular. In *Análisis sensorial. Metodología*. Madrid, Spain: Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR)
- Wang, Q., Hu, X., Du, Y., & Kennedy, J. F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 82, 842-847.
- Wang, R., Wang, R., & Yang, B. (2009). Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 289-292.
- Wendakoon, C., & Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of food protection*, 58(3), 280-283.
- Yang, Y., Campanella, O. H., Hamaker, B. R., Zhang, G., & Gu, Z. (2013). Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations. *Food Hydrocolloids*, 30, 26-32.
- Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., & Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81(4), 686-692.

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Resumen

En el presente trabajo se realizó un bioensayo de concentración-respuesta frente a la mosca de la fruta (*Ceratitits capitata*), para evaluar la actividad insecticida de películas biodegradables formuladas con aceite esencial de clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*) o citronela (*Cymbopogon nardus*). Se registró el tiempo que tardaron las moscas en caer abatidas tras la exposición a películas de proteína de soja reticulada y lignina que contenían de aceite esencial de clavo o de citronela (3%), o las películas control sin compuestos bioactivos. Los compuestos volátiles liberados de la película con aceite esencial de clavo al 3% fueron eficaces para abatir las moscas (40% después de 4 h de exposición) y tras 20 h, el 90% de las moscas había muerto. Sin embargo, las películas con aceite esencial de citronela mostraron poca actividad insecticida. La mayor actividad insecticida de este aceite se observó en forma pura, probablemente porque uno o dos de sus ingredientes activos (citronelal y geraniol) apenas se liberaron de la película. En este trabajo, por primera vez se desarrolló un nuevo sistema de envase que controla la liberación de aceites esenciales de clavo de olor con buena actividad insecticida frente a *Ceratitits capitata*, que se puede utilizar para mejorar la calidad de frutas y productos alimenticios.

Palabras clave: películas biodegradables, *Ceratitits capitata*, *Cymbopogon nardus*, *Eugenia caryophyllata*, actividad insecticida, aceite esencial.

Introducción

Los aceites esenciales (AE) comprenden la fracción de la planta obtenida por destilación por arrastre de vapor y son responsables por el olor característico de las plantas (Enan, 2001). Los componentes principales de los AE son los terpenos de bajo peso molecular y las resinas fenólicas, las moléculas lipofílicas se caracterizan por tener una presión de vapor alta y por lo tanto una potencial toxicidad con efecto de fumigación (Adams, 2007).

En los últimos años, el uso de AE derivados de las plantas aromáticas como insecticidas de bajo riesgo ha aumentado considerablemente debido a su popularidad con los agricultores orgánicos y consumidores conscientes del medio ambiente (Regnault-Roger, Vincent, y Arnason, 2012). El uso de productos químicos sintéticos para controlar insectos plantea varias inquietudes relacionadas con el medio ambiente y la salud humana, y productos alternativos naturales que sean eficaces y respetuosos con el ambiente (Nerio, Olivero-Verbel, y Stashenko,

2010). Sin embargo desde un punto de vista económico, los productos químicos sintéticos aún se utilizan con frecuencia como repelentes mientras que los aceites esenciales (productos naturales extraídos de plantas del género Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae y Asteraceae) tienen el potencial para proporcionar repelentes eficientes y seguros para los seres humanos y el medio ambiente (Nerio, Olivero-Verbel, y Stashenko, 2010).

Los AE tienen efectos repelentes, insecticidas y reducen el crecimiento de una gran variedad de insectos y se han utilizado eficazmente para control de insectos fitófagos pre y post-cosecha y como repelentes de insectos mordedores, moscas e insectos del hogar y del jardín (Tripathi *et al.*, 2002).

El aceite esencial de clavo de *Eugenia caryophyllata* Thunb (Myrtaceae), tiene actividad insecticida contra algunos insectos de productos almacenados, el ácaro americano y el europeo, ambos del polvo de casa (Kim, Kim, y Ahn, 2003). Park y Shin, (2005) observaron que los principales compuestos del AE de clavo, eugenol (86,1%) y α -cariofileno (11,1%), poseen actividad anti-termitas que se atribuye principalmente a la acción de eugenol. El eugenol es un compuesto fenólico conocido por su actividad farmacológica versátil, incluyendo anestesia local, antiinflamatorio, analgésico, antimicrobiano, antitumoral y precursor del crecimiento de pelo (Pramod, Ansari, y Ali, 2010; Zhang, Zhang, Xiao, Chen, y Xu, 2013).

El AE de citronela *Cymbopogon* spp., es popular en las formulaciones de repelentes de mosquitos. Las velas e inciensos que contienen aceite de citronela se venden como repelentes de insectos en varios países. A pesar de la creencia popular, se ha documentado que las velas o el incienso de citronela son eficaces para reducir la presión de la mordida de los mosquitos (Fradin y Day, 2002). Las posibles razones pueden ser liberación descontrolada del aceite, es decir, se libera en poca cantidad y se vuelve insuficiente o se libera en exceso y por tanto tiene una menor duración y efecto protector. Por lo tanto, controlar la liberación de estos aceites esenciales es un área que merece la pena investigar (Hsieh, Chang, y Gao, 2006). Además, los productos químicos sintéticos usados para el control de vectores generan daños irreversibles en el ecosistema, ya que algunos de ellos no son biodegradables (Fradin y Day, 2002). Estos problemas han puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar alternativas efectivas.

Las películas biodegradables se preparan a partir de material comestible que actúan a modo de barrera para elementos externos (factores como la humedad, aceites, gases y vapores) y así protegen el producto, extienden su vida útil y mejoran su calidad (Suyatma, Tighzert, Copinet, y Coma, 2005). Diversos ingredientes alimentarios (derivados de carnes, cereales, frutos secos,

frutas y verduras), se utilizan para producir películas comestibles laminadas o bolsas. Estas películas actúan como sistemas de envasado y controlan la liberación de compuestos activos tales como antioxidantes, sabores y agentes antimicrobianos en los alimentos para su protección y preservación, ya que ofrecen ventajas sobre los materiales sintéticos, como el ser biodegradables y respetuosos con el ambiente (Tharanathan, 2003). Su aplicación como película o cobertura en la fruta cuando aún está en la planta es una forma interesante de eliminar los plásticos, cuya utilización conduce a un aumento en los desechos al medio ambiente y que consume gran cantidad de energía. Estas películas o coberturas además confieren la función de repelente o insecticida si contienen el ingrediente activo adecuado (Kyrikou y Briassoulis, 2007).

Los AE de las plantas pueden proporcionar alternativas viables al control de insectos utilizados actualmente porque constituyen una fuente rica de compuestos bioactivos químicos que comúnmente se utilizan como agentes saborizantes y fragancias para alimentos y bebidas (Isman, 2000). Este trabajo se evaluó el potencial de las películas biodegradables a las que se incorpora AE de clavo o citronela en la protección de cultivos o de frutas frente al ataque de insectos. La actividad insecticida de los aceites esenciales se realizó mediante un bioensayo de fumigación contra adultos de *Ceratitis capitata*.

Materiales y métodos

Preparación de las películas. Las películas se elaboraron por la técnica del moldeo mediante un proceso de dos etapas para la obtención de una película de bicapa. La primera capa se preparó como sigue: la proteína de aislado de soja (SPI) (PRO FAM, ADM, Decatur, IL, USA) se disolvió en agua destilada (4 g/100mL) a temperatura ambiente hasta disolución completa, se añadió glicerol (1% p/v) y se ajustó el pH hasta 8,0 con NaOH 2N. Posteriormente se adicionó formaldehído (3,3 mmol/100 mL), se agitó durante 10 min y se ajustó el pH hasta 10,5 utilizando NaOH 2N. Además se preparó una solución de lignina comercial (Protobind 1000, Granit R y D SA, Lausanne, Suiza) en agua destilada a una concentración final de 0,6% (p/v) respecto a la solución formadora de película (SFP). Esta concentración fue seleccionada en base a resultados previos. La mezcla se agitó durante 15 min a 40 °C y se incrementó el pH hasta ~11,0 para obtener una mezcla totalmente soluble. Finalmente, las dos soluciones descritas anteriormente se mezclaron y 25 mL de las nuevas SFR se repartieron en una placa de plexiglás (12 x 12 cm.²) y se secaron a 45 °C en un horno de aire forzado (Bind FD 240, Tuttingen, Alemania) durante 6 h. La segunda capa se preparó siguiendo el mismo método descrito anteriormente, excepto que el plastificante (glicerol) fue reemplazado en un ensayo

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

por aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*, Isabrubotanik S.A, Ambato-Ecuador) y en el otro por aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllata*, Isabrubotanik S.A) en concentraciones de 1,5 o 3% (p/p). En ambos casos, los aceites se homogeneizaron con Ultra-Turrax (T25, IKA Werke GmbH & Co KGStaufen, Alemania) durante 3 min a 17500 rpm. Los aceites esenciales contenían principalmente eugenol 85% (clavo) y 36% citronelal y 21% geraniol (citronela), (datos proporcionados por la empresa).

Posteriormente la solución de lignina se agregó y mezcló con agitación constante para evitar la formación de burbujas. Cada SFP que contenía el AE (25 mL) fue lentamente vertida sobre la primera capa y secadas a 45 °C en un horno de aire forzado (Bind FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 6 h. Las películas obtenidas se acondicionaron en una solución saturada de KBr (58% humedad relativa, HR) durante 5 días.

Insectos. Las moscas (*Ceratitis capitata*) tipo salvaje (cepa "Mendoza") se criaron en medio base de calabaza (Pujol-Lereis, Rabossi, Filiberti, Argaraña, y Quesada-Allué, 2006) y se mantuvieron en una cámara Conviron (CMP 3244) a 23 °C, 50-60% HR, con fotoperíodos de 16:8 (luz:oscuridad). Estos insectos se utilizaron para poner huevos de una población representativa del estándar del laboratorio. En todos los experimentos se utilizaron moscas adultas con menos de 2 días de edad que fueron recogidas bajo CO₂ y colocadas en frascos con libre acceso a una fuente de agua y alimento en base a sacarosa:levadura seca (3:1) y agar al 1%, respectivamente.

Bioensayo. El efecto del AE y las películas que contenían estos aceites se evaluaron siguiendo un bioensayo de fumigación descrito por Tarelli, Zerba, y Alzogaray, (2009) con algunas modificaciones.

Las soluciones de AE de clavo y citronela (1, 3 y 6%) se prepararon en 1% de glicerol (p/v). La solución fue distribuida en un área de 3,5 o 30 cm² en una placa Petri cubierta con un trozo de gasa (malla de 2 mm) para evitar el contacto directo de la mosca con la solución (Figura 1). Las películas de aproximadamente 4 y 36 cm² (con 3% de AE de clavo o citronela, 5,2 mg AE/cm²) se suspendieron desde la parte superior de un matraz de 1 L (18 cm de altura, 10,5 cm de diámetro en la parte inferior y 7,5 cm de diámetro en la parte superior). Para evitar el contacto directo de las moscas, cada película fue recubierta también con un trozo de gasa (Figura 1).

Los grupos de 25 moscas vírgenes que representan una población de laboratorio se refrigeraron a 4 °C y rápidamente se introdujeron en el frasco experimental. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento. Después de un período de 20 minutos de equilibrio, comenzó

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

el tiempo del ensayo de abatimiento de las moscas. El número de moscas abatidas fue contabilizado a los 30 min, 1, 2, 3 y 4 horas. Se consideró que una mosca cae abatida cuando está acostada en la base de la cámara en posición supina o cuando es incapaz de caminar (la mosca responde a estímulos mecánicos). El efecto insecticida del AE y las películas se determinó contando las moscas muertas después 20 h de exposición (no responde a los estímulos mecánicos).

Análisis de datos. El tratamiento de datos se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Resultados

La actividad insecticida de las películas biodegradables a las que se incorporó AE de clavo o de citronela frente a *C. capitata* se evaluó en una cámara experimental descrita en la Figura 1. La actividad insecticida del AE de clavo y citronela en películas de SPI reticulada-lignina se evaluó utilizando trozos de película (4 o 36 cm²) y registrando la mortalidad de adultos de *C. capitata* después de 20 h de exposición. En la Tabla 1 se muestra que la mayor mortalidad de las moscas se obtuvo al utilizar una película de 36 cm² con 3% de AE de clavo (90% de las moscas muertas), mientras que con la misma concentración de citronela, sólo un 14% de moscas murió ($p < 0,0001$). En las películas control (4 y 36 cm² sin AE) se obtuvo un porcentaje insignificante en la mortalidad de la mosca de la fruta.

En la Figura 2 se muestra el porcentaje acumulado de moscas que cayeron abatidas durante 4 horas de exposición a las películas de clavo o citronela (4 y 36 cm²). El número de moscas abatidas se registró cada 30 minutos durante las primeras 4 h. La Figura 2A muestra que el 3% de AE de clavo puede abatir al 40% de las moscas durante las primeras 4 h de exposición utilizando 36 cm² de película, mientras que no se registró una actividad significativa al utilizar películas con 4 cm² (las diferencias entre las pendientes son significativas, $p = 0,001$). Por otro lado, la Figura 2B muestra que la película que contenía AE de citronela (3%) no presentó un efecto insecticida notable al utilizar películas de 4 y 36 cm². Sin embargo, el aceite de citronela alteró el comportamiento de las moscas; las moscas estaban inmóviles, distribuidas en diferentes partes de la cámara experimental y limpiaban permanentemente su cabeza y el tórax con las patas anteriores. Trisyono, (2012), describió que la citronela puede perturbar el comportamiento en la mosca de la fruta.

Dado que posiblemente parte del aceite esencial estuviera retenido en la película, también se determinó el efecto del AE de citronela dispuesto en una placa Petri de vidrio (4 cm²) o en

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

papel. La Figura 3A muestra, en porcentaje acumulado, el 60% de moscas abatidas al ser expuestas durante 4h al AE de citronela (3%) sobre papel. La clara actividad insecticida frente a la mosca de la fruta se manifestó incluso al utilizar una cuarta parte de la concentración de los bioactivos que se incluyó en la película. Además, más del 80% de las moscas fueron abatidas al utilizar un 6% de AE de citronela (Figura 3A). Por otra parte, al dispersar el AE de citronela en las placas Petri se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados). En base a lo anteriormente expuesto, los compuestos bioactivos del AE de citronela, responsables del efecto de fumigación, pudieran estar atrapados en la película.

En la Figura 3B se muestra que el AE de clavo distribuido en papel (3,5 cm²), en concentraciones del 1 a 6%, después de 4 h de exposición obtuvo un menor porcentaje acumulado de abatimiento de las moscas *Ceratitis capitata*. Es más, sólo el 10% de las moscas fueron abatidas con 6% de AE de clavo. El AE de clavo del 1 a 6% testado en placa de Petri presentó porcentajes similares a los obtenidos utilizando papel. Se realizó un nuevo experimento para comparar con mayor precisión la eficacia insecticida del AE de clavo (3%) de incorporado en la película (36 cm²) *versus* el AE solo distribuido sobre un área similar. La Tabla 2 muestra la mortalidad de las moscas *Ceratitis capitata* tras 20 h de exposición utilizando un 3% de AE distribuido en una superficie de 30 cm². Los resultados indican que el 3% de AE de clavo solo, distribuido en 30 cm² de superficie mostró un considerable porcentaje de mortalidad (55,94%; $p \leq 0,05$), confirmando así la actividad insecticida del AE de clavo.

Los resultados indican que una superficie de 36 cm² de películas SPI reticulada-lignina a la que se incorpora un 3% de AE de clavo puede ser útil como insecticida, mientras que al utilizar 3% de AE de citronela la actividad insecticida es más leve.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de moscas *Ceratitis* evaluado con películas bicapa de SPI reticulada y lignina con 3% de aceite esenciales de clavo o citronela. La mortalidad se registró después de 20 h de exposición. El ensayo se repitió cuatro veces con 25 adultos por ensayo. No se registraron diferencias significativas con el área de 4 cm² ($p=0,27550$); diferencias significativas con el área de 36 cm² ($p \leq 0,0001$).

Película (cm ²)	N	Tratamiento (% de mortalidad \pm SD)		
		Sin AE	AE clavo	AE Citronela
4	4	5,04 \pm 1,97	8,00 \pm 9,24	13,0 \pm 2,00
36	4	3,50 \pm 2,52	90,00 \pm 4,00	14,0 \pm 6,93

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de moscas *Ceratitis* evaluado con 3% de aceite esencial de clavo distribuido sobre una placa de vidrio. La mortalidad se registró después de 20 h de exposición. El ensayo se repitió cuatro veces con 25 adultos por ensayo. Diferencias significativas con el área de 3,5 cm²: ($p \geq 0,05$) y 30 cm² ($p \leq 0,05$).

Placa de vidrio (cm ²)	N	Tratamiento (% de mortalidad \pm SD)	
		Sin AE	AE clavo
3,5	4	0	2,50 \pm 2,89
30,0	4	4,02 \pm 2,68	55,94 \pm 17,09

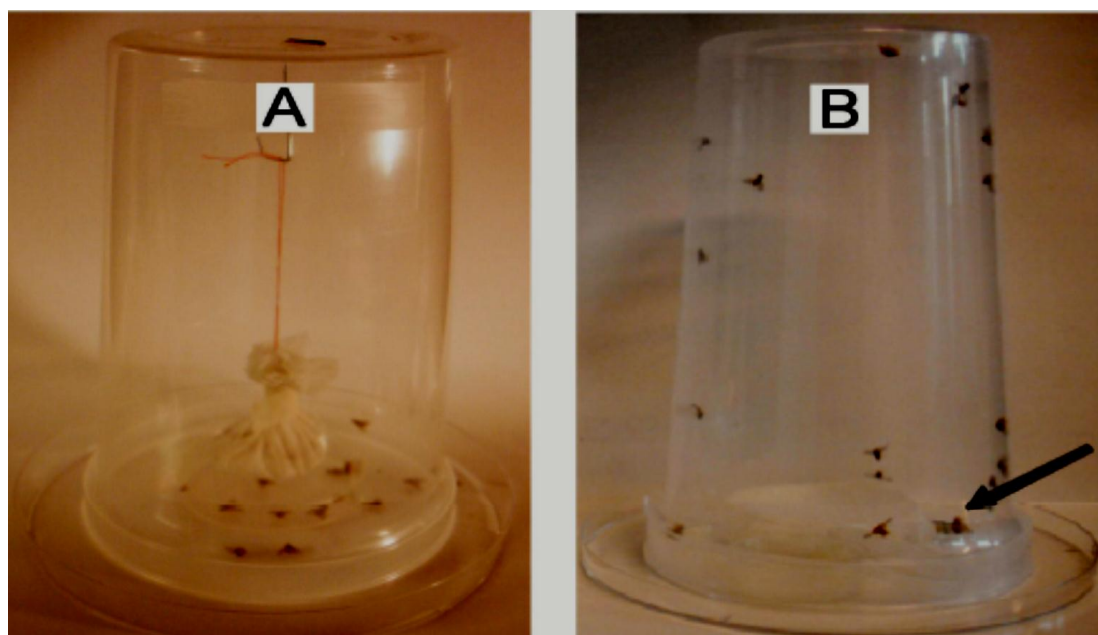


Figura 1. Cámaras experimentales para evaluar el efecto repelente y/o insecticida de las películas con AE de clavo o citronela (A), y AE distribuido sobre un papel filtro o sobre la placa de vidrio (B). El AE colocados en el papel filtro Whatman Nº 3 o solos, se dispusieron dentro de una placa de vidrio. Las películas y las placas de vidrio se protegieron con una gasa para impedir el contacto directo con las moscas (A y B). Las flechas indican moscas abatidas en la base de la cámara.

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

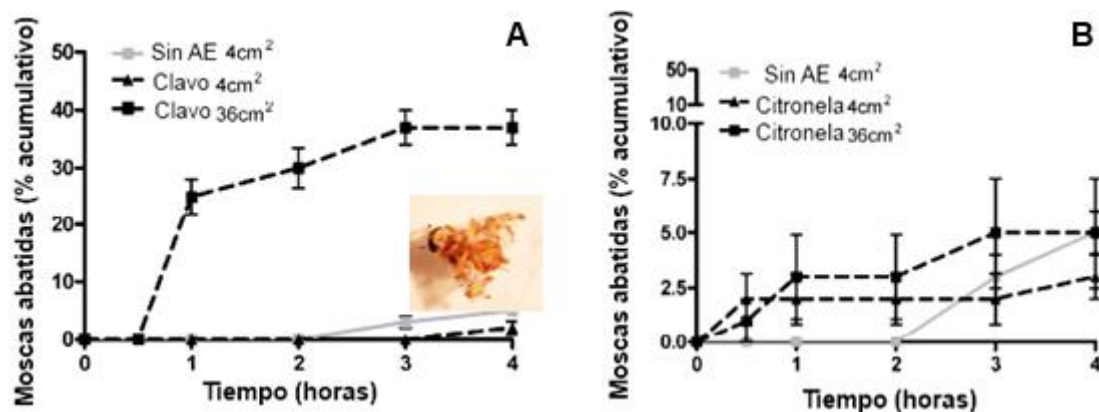


Figura 2. Porcentaje acumulado de moscas *Ceratitis capitata* abatidas, expuestas o no a las películas de proteína de aislado de soja y lignina. (A) Película con 3% de AE de clavo y (B) citronela. Las películas control, sin AE de 4 y 36 cm², causaron un porcentaje similar de moscas abatidas. El ensayo se repitió cuatro veces con 25 adultos por ensayo.

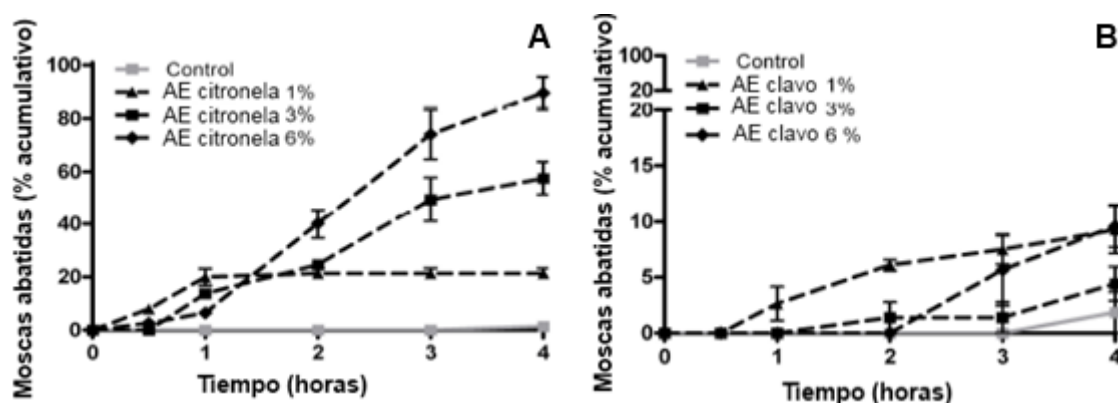


Figura 3. Porcentaje acumulado de moscas *Ceratitis capitata* abatidas una vez expuestas a papel filtro Whatman Nº 3 impregnado con AE de citronela en 1% de glicerol (A) o AE de clavo en 1% de glicerol (B). Los controles fueron papeles impregnados con 1% de glicerol sin AE. El ensayo se repitió cuatro veces con 25 adultos por ensayo.

Discusión

Los resultados obtenidos mostraron por primera vez un método eficiente para atrapar AE de clavo y desarrollar películas biodegradables con proteína de soja reticulada y lignina con propiedades insecticidas. Las películas bicapa se prepararon con proteína de soja, lignina y glicerol (1% p/v) en la primera capa y el aceite esencial (3% p/p) se añadió únicamente en la segunda capa. Estas películas biodegradables fueron activas frente a la mosca de la fruta *C. capitata* en el bioensayo de fumigación *en vivo* realizado.

Después de la incorporación de AE de clavo, la actividad insecticida de la película fue evidente. La película de SPI reticulada-lignina con AE de clavo (36 cm²) fueron efectivos para abatir las moscas y presentaron una mayor mortalidad que al utilizar el aceite solo (Figura 3B, Tabla 2). El AE de clavo utilizado contiene una alta concentración de eugenol (85%) como compuesto principal. Recientemente Zhang, Zhang, Xiao, Chen, y Xu, (2013) observaron que la aplicación de eugenol está enormemente limitada principalmente debido a sus propiedades fisicoquímicas no deseadas, tales como baja solubilidad, posibilidad de sublimación, etc. Si bien no se puede descartar que estos fenómenos ocurran, resulta evidente que el compuesto está parcialmente asociado a la película y al estar en alta concentración mantiene su potencial activo. Además, es razonable pensar que el incremento en la actividad insecticida en la película que contiene 3% de AE de clavo frente a utilizar el aceite solo (90% vs. 55%, Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente) puede atribuirse a un posible cambio en las propiedades físico-químicas de los compuestos bioactivos del AE de clavo probablemente asociado a un aumento en la tasa de evaporación del AE esencial de clavo tras su incorporación en las películas. En este sentido, la actividad antimicrobiana del aceite esencial de clavo se mantuvo cuando se incorporó en películas comestibles de gelatina bovina y quitosano, sin diferencias entre las matrices empleadas (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010). Sin embargo, estos autores observaron algunas diferencias con respecto a la solubilidad en agua que podría determinar la liberación de compuestos bioactivos y afectar la actividad biológica de las películas, ya que las películas de gelatina-quitosano y AE de clavo son menos solubles que las películas de gelatina y AE de clavo. Por lo tanto, la incorporación del aceite esencial de clavo en las películas podría suponer ciertas ventajas durante la liberación de compuestos activos, extendiendo la bioactividad de las películas.

El AE de citronela mostró un efecto diferente; si bien obtuvo una mayor actividad insecticida en forma pura, una vez que el AE se incorporó en la película no se observó un efecto insecticida considerable. El AE de citronela se liberó, tanto cuando se usó en forma libre como desde el papel impregnado, pero al incorporarlo en las películas, probablemente uno o dos de sus principales compuestos bioactivos (citronelal y el geraniol) no se liberaron correctamente. Es bien sabido que el AE de citronela posee una gran actividad repelente de mosquitos y una alta volatilidad, sin embargo la cantidad de AE de citronela liberado depende del tipo de material utilizado en la microencapsulación (Solomon, Sahle, Gebre-Mariam, Asres, y Neubert, 2012).

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

En la actualidad, el uso de productos químicos sintéticos para el control de insectos plantea varias inquietudes relacionadas con el medio ambiente y la salud humana. Una alternativa es utilizar productos naturales que poseen buena eficacia y que además son respetuosos con el medio ambiente. Muchos aceites esenciales y productos fitoquímicos son conocidos por poseer actividad insecticida o repelente. Entre esos productos químicos, los AE de plantas de varias especies se han testado ampliamente para evaluar sus propiedades repelentes y se consideran como un valioso recurso natural (Nerio, Olivero-Verbel, y Stashenko, 2010). Estos compuestos pueden ejercer su actividad sobre los insectos a través de efectos neurotóxicos que involucran varios mecanismos, en particular a través del ácido gamma-aminobutírico, sinapsis de la octopamina y la inhibición de la acetilcolinesterasa. Con unas cuantas excepciones, su toxicidad frente a los mamíferos es baja y su persistencia en el ambiente es corta. La autorización sanitaria ha sido el principal cuello de botella en la elaboración de nuevos productos para el mercado. Sin embargo muchos de los AE han sido aprobados para su uso en los Estados Unidos y en otros lugares debido al bajo riesgo que implican estos materiales (Regnault-Roger, Vincent, y Arnason, 2012).

Este trabajo presenta la aplicación de películas biodegradables para un nuevo sistema de envasado que controla la liberación de compuestos activos con efecto repelente e insecticida contra la mosca de la fruta *Ceratitis capitata*. La utilización del aceite esencial de clavo y sus constituyentes como nuevos agentes con estas propiedades sobre los insectos requieren estudios en profundidad para el desarrollo de formulaciones que mejoren la eficacia de películas biodegradables.

Bibliografía

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*: Allured Publishing Corporation.
- Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325-337.
- Fradin, M. S., & Day, J. F. (2002). Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England Journal of Medicine*, 347(1), 13-18.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Hsieh, W.-C., Chang, C.-P., & Gao, Y.-L. (2006). Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2), 209-214.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8), 603-608.

Capítulo 7. Películas biodegradables con aceite esencial de clavo o citronela frente a la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

- Kim, E.-H., Kim, H.-K., & Ahn, Y.-J. (2003). Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 885-889.
- Kyrikou, I., & Briassoulis, D. (2007). Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. *Journal of Polymers and the Environment*, 15(2), 125-150.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372-378.
- Park, I.-K., & Shin, S.-C. (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4388-4392.
- Pramod, K., Ansari, S. H., & Ali, J. (2010). Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. *Natural product communications*, 5(12), 1999-2006.
- Pujol-Lereis, L., Rabossi, A., Filiberti, A., Argaraña, C., & Quesada-Allué, L. (2006). *D. melanogaster* and *H. irritans* are more sensitive to Phloxine B phototoxicity than *C. capitata*. *Drosoph. Inf. Serv.*, 89, 82-84.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual review of entomology*, 57, 405-424.
- Solomon, B., Sahle, F., Gebre-Mariam, T., Asres, K., & Neubert, R. (2012). Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and *in vitro* permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(1), 61-66.
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. (2005). Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 3950-3957.
- Tarelli, G., Zerba, E., & Alzogaray, R. A. (2009). Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 102(3), 1383-1388.
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78.
- Tripathi, A., Prajapati, V., Verma, N., Bahl, J., Bansal, R., Khanuja, S. P. S., & Kumar, S. (2002). Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* (var. ch-66) on three species of stored-product beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology*, 95(1), 183-189.
- Trisyono, Y. (2012). Effects of citronella grass extract on the oviposition behavior of *Carambola* fruit fly (*Bactrocera carambolae*) in mango. *Journal of Agricultural & Biological Science*, 7(9), 672.
- Zhang, P., Zhang, E., Xiao, M., Chen, C., & Xu, W. (2013). Enhanced chemical and biological activities of a newly biosynthesized eugenol glycoconjugate, eugenol α -D-glucopyranoside. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1043-1050.

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

Resumen

En este trabajo se desarrollaron películas bicapa activas biodegradables de proteína de soja, lignina y formaldehído. Estas películas demostraron una alta resistencia al agua y maleabilidad, lo que las hace adecuadas para su uso en condiciones ambientales extremas. La presencia de lignina en la formulación proporcionó protección contra la luz, especialmente la UV. Con la adición de 3% de aceite esencial de citronela (p/p), las películas mostraron una buena actividad antifúngica contra el microorganismo patógeno en plátanos *Fusarium oxysporum*. Estas mismas películas se utilizaron para recubrir plátanos y se almacenaron durante 6 días, en los que se obtuvo una reducción significativa en el recuento de mesófilos aerobios viables, mohos y levaduras. Posteriormente, las películas se mantuvieron (1, 3, 6 meses) en condiciones controladas (58% HR y 21 °C) y medioambientales. Durante este tiempo tuvo lugar la liberación de los principales compuestos activos presentes en el aceite esencial de citronela, citronelal y el geraniol, siendo mayor la liberación de citronelal. Después de 30 días de exposición en el suelo se observó en las películas un proceso de degradación, con pérdidas de peso de alrededor del 30%, independientemente del tiempo previo de almacenamiento.

Palabras clave: películas, actividad antimicrobiana, citronela, biodegradación.

Introducción

En la agricultura es una práctica común colocar bolsas sobre los cultivos de frutas para prevenir el daño por insectos. Esta práctica asegura que el producto llegue al mercado libre de defectos o magulladuras y así favorece la calidad de los alimentos y su conservación (Fallik, Temkin-Gorodeiski, Grinberg, y Davidson, 1995). En este sentido, por ejemplo, se ha observado que almacenar frutas dentro de bolsas de plástico previene de lesiones por frío o reduce la incidencia de un sabor amargo en las manzanas, según indican Watkins y Thompson (1992). Sin embargo, cuando las bolsas se retiran, por lo general se reciclan, lo que implica un coste adicional, o directamente se desechan, con el consiguiente perjuicio ambiental si el material no se degrada en un periodo razonable de tiempo.

Los biopolímeros ofrecen una potencial alternativa para superar las limitaciones de los plásticos sintéticos. Presentan una buena capacidad formadora de película y tienen propiedades que los hacen adecuados para muchas aplicaciones, entre ellas servir como material de embalaje en general (Van de Velde y Kiekens, 2002). Los biopolímeros son mucho

más biodegradables que los plásticos. Además, el periodo de biodegradación de los materiales en base a biopolímeros es mucho más corto, oscilando entre los 3 y 33 días (Dalev, Patil, Mark, Vassileva, y Fakirov, 2000; González, Strumia, y Alvarez Igarzabal, 2011; Martucci y Ruseckaite, 2009; Patil, Dalev, Mark, Vassileva, y Fakirov, 2000). La biodegradación depende de varios factores, entre ellos las características de la película (tipo de biopolímero utilizado, la estructura, composición, reticulación, movilidad de la cadena, cristalinidad, etc.) y presencia de enzimas hidrolíticas en el suelo (Rizzarelli, Puglisi, y Montaudou, 2004). Las condiciones ambientales determinarán el comportamiento de los biopolímeros durante la degradación, especialmente la composición del suelo, presencia de microorganismos y humedad (González *et al.*, 2011).

La proteína de aislado de soja es un biopolímero biodegradable y respetuoso con el ambiente, y tiene un gran potencial su uso como material de envasado, películas biodegradables o recubrimientos. Mediante el uso de tratamientos químicos se pueden modificar sus características con el fin de producir películas con buenas propiedades fisicoquímicas y además permitir que actúen como soporte de compuestos activos. Por otra parte, los aceites esenciales se han utilizado como compuestos antimicrobianos y repelentes de insectos. El aceite esencial (AE) de citronela posee propiedades como repelente de insectos, herbicida y antimicrobiano y por lo tanto puede utilizarse para reemplazar insecticidas químicos y evitar así los efectos nocivos de estos últimos sobre la vida acuática y la salud humana (Moraes, Elfvendahl, Kylin, y Molander, 2003). Su uso en formulaciones repelentes de mosquitos y en el control de la maleza para la agricultura orgánica parece ser un campo prometedor (Arancibia *et al.*, 2013), si bien estos herbicidas naturales actúan muy rápidamente y su eficacia es limitada debido a su rápida volatilización (Dayan, Cantrell, y Duke, 2009; Thorsell, Mikiver, Malander, y Tunón, 1998). Además los aceites esenciales pueden quedar atrapados y liberarse lentamente de una matriz o película y formar "envases activos", una de las innovaciones más prometedoras en este momento (Licciardello, Muratore, Suma, Russo, y Nerín, 2013).

El objetivo de este trabajo fue determinar la liberación de los compuestos activos volátiles de películas de proteína de aislado de soja -lignina-formaldehído con la incorporación de aceite esencial de citronela. El estudio de la actividad antimicrobiana durante el acondicionamiento de las películas activas, así como determinar su potencial biodegradación también fue objeto de estudio.

Materiales y métodos

Preparación de películas bicapa

Las películas se obtuvieron por la técnica de moldeo mediante un proceso en dos etapas a fin de obtener una película bicapa como se describió anteriormente (Arancibia *et al.*, 2013). Para elaborar la primera capa se disolvió en agua la proteína de aislado de soja (SPI) (PRO FAM, ADM, Decatur, IL, USA) (4g / 100mL) a temperatura ambiente hasta su completa disolución. Después se agregó glicerol (1% w/v) y se ajustó el pH a 8,0 con NaOH 2N, y a continuación se añadió formaldehído (FA) (0,35 g/100 ml), se agitó durante 10 min y se ajustó el pH a 10,5 utilizando NaOH 2N. Simultáneamente se preparó una solución de lignina (Protobind 1000, Granit R y D SA, Lausanne, Suiza) en agua destilada a una concentración final en la solución filmogénica de 0,6% (p/v). La mezcla se agitó a 40 °C durante 15 min y se alcalinizó a pH = ~11,0 para obtener una mezcla totalmente soluble. Finalmente, las dos soluciones descritas anteriormente se mezclaron y se tomó una alícuota (25 mL) de la mezcla final que se extendió sobre una placa de plexiglás ($\varnothing = 12 \times 12 \text{ cm.}^2$) y se secó en una estufa de aire forzado (Bind FD 240, Tutlingen, Alemania) a 45 °C durante 6 h. Para preparar la segunda capa se siguió el mismo procedimiento descrito, sustituyendo el plastificante (glicerol) por el aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*, Isabrubotanik S.A, Ambato-Ecuador) al 3% (p/p), que se homogeneizó con un Ultra-Turrax (T25, IKA Werke GmbH y Co KG, Staufen, Alemania) durante 3 min a 17500 rpm. Seguidamente, se adicionó la solución de lignina con agitación magnética para evitar la formación de burbujas. La solución filmogénica que contiene el aceite esencial (segunda capa) fue vertida lentamente sobre la primera capa y se secó 45 °C en una estufa (Binder FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 6 h. Estas películas se denominaron SLC. La segunda capa de las películas control (sin AE) se preparó siguiendo el mismo método descrito anteriormente con la adición de glicerol (1% p/v) en lugar del AE. Estas películas se denominaron SL.

Almacenamiento de las películas

Para algunas de las determinaciones que se describen a continuación, las películas bicapa resultantes SLC, se almacenaron durante 1, 3 y 6 meses bajo condiciones controladas (58% de humedad relativa (HR) y $21 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (lote: 58%). Con la finalidad de simular condiciones ambientales y determinar los cambios que podrían sufrir las películas cuando se aplican en un sistema agrícola, otro lote de películas SLC se almacenó en el exterior (expuestas a condiciones ambientales) durante el mismo periodo de 1, 3 y 6 meses (lote: CE). La temperatura y humedad relativa a las que se sometió este lote se indican en la Tabla 1.

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

Tabla 1. Temperatura (máxima y mínima) y humedad media en Madrid (España) durante los meses de enero a agosto del 2013 (AEMET 2013).

Parámetros	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Temperatura Máxima (°C)	10,66 ± 0,56	11,03 ± 1,37	12,98 ± 2,82	17,75 ± 0,25	20,64 ± 1,16	28,21 ± 0,51	34,22 ± 2,12	33,90 ± 2,2
Temperatura Mínima (°C)	2,66 ± 1,20	2,16 ± 0,54	5,29 ± 0,89	7,34 ± 1,14	8,68 ± 1,12	13,89 ± 0,31	20,35 ± 2,75	19,88 ± 2,58
Humedad relativa (%)	79,91 ± 11,86	70,94 ± 12,97	80,05 ± 10,09	65,78 ± 14,02	59,26 ± 17,64	44,63 ± 17,22	34,41 ± 15,03	35,34 ± 15,22

Determinaciones en las películas

Espesor

El espesor de las películas SLC se midió utilizando un micrómetro (MDC - 25M, Mitutoyo, Kanagawa, Japón), en diferentes lugares (4-6) tomados al azar y en un promedio de 15 películas.

Propiedades de barrera al agua

El contenido de agua de cada película preacondicionada SLC se determinó por secado de alrededor de 0,5 g a 105 °C durante 24 h, según la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C, 1995), al menos por triplicado. El contenido en agua se expresó como porcentaje del peso total.

Para la prueba de solubilidad de agua, las películas SLC se cortaron a modo de un círculo con un diámetro de 40 mm y se colocaron en recipientes de plástico con 50 mL de agua destilada a 22 °C durante 24 h. A continuación, la solución se filtró a través de papel filtro Whatman # 1 para recuperar la película restante sin disolver, que fue posteriormente desecada a 105 °C durante 24 h. La solubilidad de la película FS (%) se calculó mediante la expresión $[(W_o - W_f) / W_o] \times 100$, donde W_o es el peso inicial de la película expresada como materia seca y W_f es el peso del residuo desecado sin disolver de la película. Todas las pruebas se realizaron al menos por triplicado.

La resistencia al agua se determinó siguiendo el método descrito por Blanco-Pascual, Fernández-Martín, y Montero, (2013). Las películas SLC se e fijaron sobre células calibradas (área 15,90 cm²) y se colocaron en desecadores que contenían agua destilada a 21 ± 1 °C. Sobre la superficie de la película se vertió agua destilada (5 mL) para determinar su resistencia al agua. La deformación de la película debida al efecto del agua, el tiempo en el que el agua

comenzó a filtrarse y el tiempo de rotura de la película se registraron durante un período de 30 días. Todas las pruebas se llevaron a cabo al menos por triplicado.

Color y luz propiedades

Los parámetros de color L^* (luminosidad), a^* (rojo/verde) y b^* (amarillo/azul) de las películas SLC se determinaron con un colorímetro Konica Minolta CM - 3500 (Konica Minolta, Madrid, España). Para las determinaciones se utilizó el iluminante D65 (luz natural) y el observador estándar D10. Las mediciones se realizaron en 5 porciones diferentes de las películas y cada valor mostrado fue el promedio de al menos 15 determinaciones.

Las propiedades de barrera a la luz y la transparencia de las películas se calcularon al menos por triplicado mediante un espectrofotómetro UV-1601 (modelo CPS-240, Shimadzu, Kyoto Japón) en las longitudes de onda de 200 a 800 nm. Las películas se cortaron en piezas rectangulares y se colocaron directamente en la celda de prueba del espectrofotómetro, utilizando una celda vacía como referencia. La transparencia (%T) se calculó siguiendo el método descrito por Ifuku *et al.*, (2007).

Espectroscopia de infrarrojo FTIR-ATR

Los espectros infrarrojos de las película entre 4000 y 650 cm^{-1} se registraron con un espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer Spectrum 400 (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA), equipado con un accesorio de cristal prisma ATR. Cada espectro fue el promedio 32 interferogramas y la resolución espectral fue 4 cm^{-1} . Las medidas se realizaron a 21 ± 1 °C. Cada una de las películas (lotes: 58% y CE) se colocaron en la superficie del cristal ATR y se presionó con un émbolo de punta plana hasta que se obtuvieron espectros con picos bien definidos y estables. Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado. La sustracción del fondo y la segunda derivado de la amida A y amida II se realizaron utilizando el software Spectrum versión 6.3.2 (Perkin Elmer Inc.).

Liberación de Citronelal y el geraniol

Los compuestos volátiles liberados de las películas de proteína de aislado de soja, lignina y aceite esencial de citronela se determinaron con la técnica de espacio de cabeza mediante cromatografía de gases-masas, GC-MS (Agilent 6890N GC, sistema acoplado directamente a un MS 5973) con un inyector robotizado de espacio de cabeza “headspace” modelo Turbomatrix HS 40. La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 220 °C. La inyección se realizó por separado con una proporción de 100:1 y el volumen inyectado fue 0,2 μL . Se

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

utilizó helio como gas portador a razón de 1,3 ml/min. El sistema de GC se equipó con una columna capilar HP-5MS (30 mm × 0,25 mm; 0,25 µm de espesor de la película). El programa de temperatura del horno se mantuvo a 45 °C durante los primeros 2 minutos, con incremento hasta 210 °C a una velocidad de 15 °C/min y después hasta 240 °C a una velocidad de 50 °C/min durante 5 min. Los espectros se obtuvieron en modo impacto electrónico con 70 eV y en modo de ión selectivo (SIM). Los resultados de los espectros de masa y tiempos de retención masa y tiempos de retención se determinaron para compuestos estándar. Los iones registrados en modo SIM fueron: Citronelal, m/z 41 y Geraniol, 69 m/z. Estos iones fueron escogidos debido a la abundancia del ion relativo con valores altos de m/z.

Para el ensayo se obtuvieron discos de 5 mm de las películas acondicionadas, tanto a 58% HR como bajo condiciones atmosféricas (EC), se colocaron en un vial de espacio de cabeza sellado herméticamente y se pesaron.

Análisis cualitativo de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas se determinó por el método de difusión de disco en placa de agar como se describió anteriormente (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010). Las películas se contaron en discos de 5 mm de diámetro que se colocaron sobre la superficie de placas de agar BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) previamente inoculadas con los microorganismos. El lado de la película en contacto directo con el agar no contenía aceite esencial. Los microorganismos, seleccionados por ser responsables del deterioro de alimentos y/u organismos potencialmente patógenos, se obtuvieron de la colección española de cepas tipo (CECT): *Debaryomyces hansenii* CECT 11364, *Penicillium expansum* DSMZ 62841, *Fusarium oxysporum* CECT 2867. Después de la incubación se observó el crecimiento microbiano con ayuda del software Corel Photo Paint X 3 y el grado de inhibición (halos) se expresó de la siguiente manera: +++: totalmente inhibido; ++: parcialmente inhibido; +: ligeramente inhibido; -: ninguna inhibición. Cada determinación se realizó por duplicado.

Microbiota en plátano durante el ensayo de almacenamiento

Para determinar el efecto antimicrobiano de las películas SLC durante el almacenamiento, se utilizaron plátanos de la variedad canaria (*Musa acuminata* Colla AAA) (5 individuos para cada lote) recubierto con las películas con y sin AE (SLC y SL, respectivamente). Los plátanos sin cobertura se utilizaron como control. Los plátanos se almacenaron a 15 °C durante 6 días. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo tomando asépticamente 10 g de plátanos pelados

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

que se colocaron junto con 90 ml de agua de peptona 0,1% (Oxoid) en bolsas estériles (Sterilin, piedra, Staffordshire, Reino Unido) y se mezclaron en un homogeneizador de palas “Stomacher” (modelo 400 Colworth, Seward, Londres) durante 1 minuto. Los microorganismos estudiados fueron microorganismos aerobios mesófilos viables en profundidad (agar para recuento en placa PCA, Oxoid), incubados a 25 °C durante 3-5 días y recuentos de mohos y levaduras en superficie (agar glucosa-extracto de levadura cloranfenicol YGC, Oxoid) incubados a 35 °C durante 24 h. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC/g). El día del inicio del experimento se consideró como día 1.

Análisis sensorial

Para juzgar las diferencias debidas a la aplicación de las películas bicapa con AE sobre los plátanos, se realizó una prueba triangular (UNE 87 006 92). Los plátanos se recubrieron dejando un espacio libre para evitar el contacto directo de la fruta con la película, tanto en las películas bicapa con AE (SLC) como en las control sin AE (SL), durante seis días a 15 °C. Un panel semi-entrenado de diez jueces probó las muestras después de retirar las películas siguiendo los procedimientos descritos por la norma UNE.

Prueba de degradación

El ensayo de degradación se llevó a cabo en suelos orgánicos naturales. Las películas SLC (12 × 12 cm), previamente acondicionadas en desecadores al 58% RH durante 1, 3 y 6 meses, se colocaron en el suelo protegidas de la luz UV a temperatura y humedad ambiental, como se indica en Tabla 1. Las películas se regaron cada dos días para simular condiciones de llovizna y al cabo de 30 días se recogieron, limpiadas y lavadas suavemente con agua destilada varias veces y se posteriormente secaron a 60 °C en estufa (Binder FD 240, Tutlingen, Alemania) durante 24 h hasta peso constante. El grado de degradación en las películas se determinó siguiendo la ecuación: pérdida de peso ($W_{\text{pérdida}}$) = $(W - W_f) / W \times 100$, donde, W y W_f es el peso de la película antes y después de la prueba de degradación en el suelo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) con un análisis de varianza de una vía. La comparación entre medias se llevó a cabo con el test de Bonferroni con un nivel de significancia de $P \leq 0,05$.

Resultados

Caracterización de la película

El espesor de las películas bicapa desarrolladas fue de $249,8 \pm 28,17 \mu\text{m}$. Este valor fue considerablemente mayor a los $70 \mu\text{m}$ de las películas multicapa (3 capas) obtenido por (Rhim, Gennadios *et al.*, 2000), debido a la irregularidad superficial causada por la adición de la segunda capa. Sin embargo, el contenido de agua de la película ($16,52\% \pm 0,25$) fue menor que $22,3\%$ descrito por (Rhim, Gennadios *et al.*, 2000) en una película de monocapa de SPI reticulada con formaldehído.

Como se muestra en la Tabla 2, las películas SLC no se rompieron durante el ensayo de resistencia al agua. Estas películas mostraron una resistencia considerable y poca deformación (alargamiento), que aumentó ligeramente desde 0,5 a 2,75 cm durante los 30 días (720 h) del experimento. La presencia de formaldehído en la formulación de la película jugó un papel clave contribuyendo a la polimerización y la insolubilización de las películas SLC. Esta técnica es novedosa y las referencias en la literatura se limitan a películas de proteína miofibrilar y algas cuya resistencia fue de al menos 2 semanas y 90 min, respectivamente (Nuria Blanco-Pascual, Fernández-Martín, y Montero, 2013; N. Blanco-Pascual, Montero, y Gómez-Guillén, 2014). Park, Bae, y Rhee, (2000) observaron un efecto de polimerización utilizando glutaraldehído, las películas desarrolladas por estos autores con SPI y glutaraldehído; las películas desarrolladas por estos autores fueron más insolubles y con mejores propiedades mecánicas por la formación de una matriz reticulada covalente. En el presente trabajo, la filtración de agua a través de la película fue apenas perceptible. La resistencia al agua es una característica deseable para películas destinadas al envasado de alimentos, especialmente si están expuestas a condiciones de alta humedad, lluvias frecuentes, etc.

Tabla 2. Parámetros de resistencia al agua: Tiempo de elongación (h), elongación (cm), filtración de agua (ml) y tiempo de rotura (h) de las películas de proteína de soja reticulada-lignina y citronela (SLC)

Tiempo de elongación (h)	0,03	0,07	0,10	0,20	0,33	0,58	50,00	72,00	720,00
Elongación (cm)	$0,50 \pm 0$	$1,10 \pm 0,14$	$1,10 \pm 0,14$	$1,25 \pm 0,35$	$1,40 \pm 0,14$	$2,00 \pm 0,00$	$2,75 \pm 0,35$	$2,75 \pm 0,35$	$2,75 \pm 0,41$
Filtración de agua (ml)	-	-	-	$0,05 \pm 0,02$	-	$0,05 \pm 0,01$	-	-	-
Tiempo de rotura (h)	Irrompible								

La solubilidad de la película (% FS) en agua fue relativamente alta ($37,43\% \pm 5,08$) en comparación con los resultados descritos por Soliman, Tawfik, Hosni, y Moharram, (2007) para películas de SPI reticuladas con FA. La solubilidad parcial de las películas bicapa podría atribuirse a la liberación de compuestos fenólicos de la lignina y al SPI parcialmente reticulada en el agua. Sin embargo, las películas mantienen su forma incluso después de la inmersión en agua durante 24 h, como también observó Núñez-Flores *et al.*, (2013) en películas de gelatina-lignina. En el presente trabajo no se separaron las capas, atributo que fue objetivo del estudio. (Rhim, Mohanty, Singh, y Ng, 2006) obtuvieron resultados similares en películas multicapa de SPI y ácido poliláctico

Propiedades de barrera a la luz

Las películas de SLC fueron uniformes en el color, con valores de $a^* = 0,27 \pm 0,18$ y $b^* = -0,38 \pm 0,13$. Núñez-Flores *et al.*, (2013) obtuvieron resultados similares en películas de gelatina-lignina (a^* : 0,46 y b^* : -0,37), que también presentaron una coloración marrón intensa producida por la adición de lignina en concentraciones similares. La lignina confirió un color marrón rojizo oscuro caracterizado por el valor de L^* ($23,81 \pm 2,07$) y croma C^*_{ab} ($0,51 \pm 0,04$). En el presente trabajo, la adición de lignina a la SPI dio lugar a películas oscuras con escasa transparencia ($0,21\% \pm 0,01$). Sin embargo, la adición de lignina a estas concentraciones provoca una mejora en las propiedades de barrera a la luz UV-VIS, atribuido a la fuerte absorción de la luz por parte de la lignina y su alta capacidad de autooxidación (Austin y Ballaré, 2010).

Espectroscopia de infrarrojo FTIR-ATR

Los espectros FTIR-ATR de las películas SL y SLC en el intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} en las diferentes condiciones de almacenamiento (controladas y ambientales) y a los diferentes tiempos se muestran en la Figura 1. La amplia banda de absorción a 3280 cm^{-1} es atribuible a la formación de enlaces de hidrógeno entre el O-H libre en las moléculas de agua adsorbida y los grupos N-H de la SPI. La intensidad de este pico disminuyó según aumentó el tiempo de almacenamiento (Fig. 1). La intensidad de la banda de las muestras almacenadas bajo condiciones controladas (58% RH) disminuyó linealmente con el tiempo $6 > 3 > 1$ mes. Esta disminución fue aún más pronunciada en las películas almacenadas en condiciones ambientales (EC), hecho que sugiere una mayor agregación proteica que implica la rotura de los enlaces del hidrógeno (Fig. 1A). A 2928 cm^{-1} se observó una señal intensa procedente del citronelal, desplazándose a frecuencias más bajas en las muestras almacenadas durante 1 mes

en condiciones ambientales (lote EC) y 3 meses bajo condiciones controladas (lote 58%). Los cambios en el desplazamiento del número de onda puede indicar una interacción entre el citronelal y la matriz de la película (Songkro *et al.*, 2012). Después del almacenamiento durante 6 meses, la banda cambió de posición hacia frecuencias más altas en ambos lotes, lo cual podría indicar una disminución en las interacciones entre el AE y la matriz de la película o la liberación del AE de la película (Fig. 1B).

Los principales picos de absorción relacionados con la amida I (estiramiento C = O, a 1630 cm^{-1}) y amida II (doblete N-H, a 1530 cm^{-1}) fueron utilizados para evaluar cambios en la reticulación de la proteína de la película (Richert *et al.*, 2003; Chang y Tanaka, 2002). La intensidad de la banda de la amida I a 1629 cm^{-1} fue mayor en las películas almacenadas al 58% RH que en las expuestas a condiciones ambientales; además, la intensidad de la banda disminuyó con el tiempo de almacenamiento, cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento, mayor parece ser la agregación de la proteína (Fig. 1C). La banda de la amida II (1539 cm^{-1}) también disminuyó con el grado de reticulación, y al igual que la amida I fue claramente dependiente de las condiciones de almacenamiento (Fig. 1C).

El pico a 1112 cm^{-1} , característico de la banda del grupo -OH de la lignina y que aparece generalmente a 1120 cm^{-1} (Wu, Wang, Li, Li, y Wang, 2009), se desplazó hacia frecuencias más altas en los lotes conservados a condiciones ambientales (EC). Esto sugiere la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre la SPI y la lignina, especialmente en las películas acondicionadas durante 3 y 6 meses. La disminución en la intensidad del pico a 1041 cm^{-1} podría estar relacionada con la pérdida de glicerol durante el almacenamiento. Las películas expuestas a condiciones ambientales mostraron una marcada disminución en la intensidad de la banda a 1041 cm^{-1} . Lodha y Netravali (2005) y Martucci y Ruseckaite (2009) observan el mismo comportamiento por durante la prueba de pérdida de peso en una resina de SPI después de solo 1 día de compostaje, lo que confirma que la mayoría del glicerol se perdió, conduciendo a un aumento significativo en la fragilidad de las películas SLC. El pico característico a 920 cm^{-1} tendió a disminuir con el tiempo, indicando que la estructura α -hélice fue alterada, especialmente en las películas EC (Fig. 1D). Li (2012) indicó que la desaparición de la banda a 921 cm^{-1} en SPI tratada con pulsos eléctricos sugiere la destrucción de la estructura α -hélice.

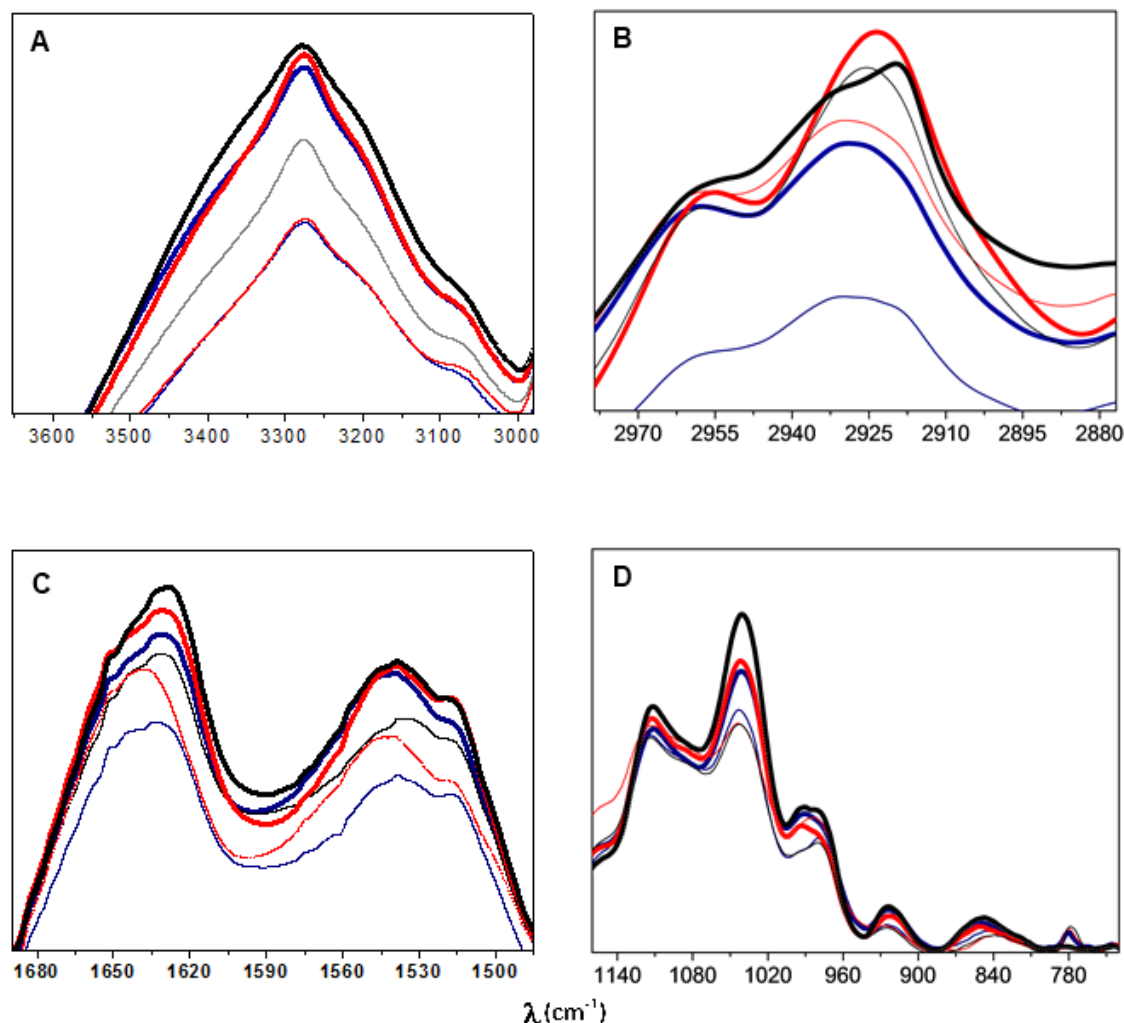


Figura 1. Espectros infrarrojo FTIR-ATR de las películas SLC almacenadas a 58% HR (línea gruesa) y en condiciones ambientales (línea fina): 1 mes de almacenamiento (negro), 3 meses (rojo) y 6 meses (azul).

Liberación de compuestos activos volátiles: citronelal y geraniol

El citronelal y el geraniol, considerados los principales componentes activos del AE de citronela (Nakahara, Alzoreky, Yoshihashi, Nguyen, y Trakoontivakorn, 2003), ejercen actividades antimicrobianas y repelentes de insectos (Amer y Mehlhorn, 2006; Andoğan *et al.*, 2002; Arancibia *et al.*, 2013; Brown y Hebert, 1997). La liberación de estos compuestos se evaluó en las películas SLC almacenadas en condiciones controladas (58%) y en condiciones ambientales (EC). La liberación de citronelal alcanzó el máximo al inicio del experimento (Fig. 2). Se observó una notable reducción, especialmente después de 3 y 6 meses de almacenamiento, principalmente en las películas expuestas al aire. En general este comportamiento fue similar en el geraniol. Los datos de liberación (Fig 2) indican un alto grado de dependencia con las

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

condiciones de almacenamiento (tiempo, temperatura y humedad). En las películas conservadas a condiciones ambientales, la liberación se relaciona con los cambios climáticos en el tiempo (Tabla 1). Las películas almacenadas en condiciones controladas (58%) mostraron una disminución de solo 2 veces la concentración de citronelal y geraniol después de 6 meses de almacenamiento. Por el contrario, la concentración de citronelal y geraniol disminuyó 10 y 7 veces, respectivamente en las películas mantenidas en condiciones ambientales después de 6 meses. (Fig. 2). La menor concentración de los compuestos activos después de 3 y 6 meses en las películas EC está probablemente asociada a la pérdida de estos compuestos volátiles por evaporación durante el "envejecimiento". Además, el citronelal y el geraniol son compuestos altamente volátiles (Godefrout, Sandra, y Verzele, 1981; Schultz, Flath, Mon, Eggling, y Teranishi, 1977) con una baja presión de vapor (mmHg 0,21 y 0,20 mmHg, respectivamente).

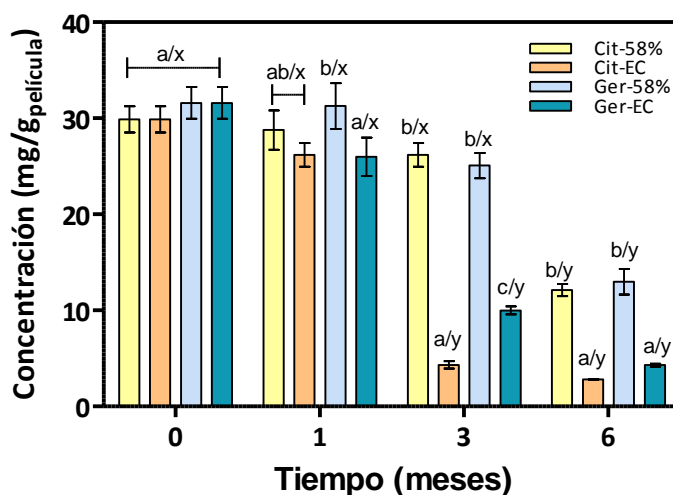


Figura 2. Concentración de citronelal (Cit) y geraniol (Ger) en la fase de vapor desprendida de las películas SLC acondicionadas a 58% HR y en condiciones ambientales (EC). Diferentes letras en el mismo tiempo (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre muestras. Diferentes letras (x,y) indican diferencias significativas en la misma muestra.

Propiedades antimicrobianas: análisis cualitativo

La actividad antimicrobiana del AE de citronela se evaluó frente a determinadas especies de hongos por el método de difusión en disco en placa de agar. *F. oxysporum* fue la especie más sensible (Tabla 3), y sin embargo, el AE de citronela no inhibió el crecimiento de *D. hansenii*. Después de la exposición de las películas a condiciones ambientales durante 1-6 meses, el efecto inhibitorio de las películas disminuyó, lo que posiblemente se asocia a la liberación de compuestos activos al suelo y a la atmósfera (Tabla 3). Es bien sabido que el AE de citronela

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

posee actividad biológica, especialmente antimicrobiana, debido a compuestos como el citronelal y el geraniol (Andoğan *et al.*, 2002; Pattnaik, Subramanyam, y Kole, 1996). Aoudou, Léopold, Michel, Xavier, y Moses (2010) documentaron la actividad antifúngica del citronelal y el geraniol contra algunos mohos, siendo el género *Fusarium* uno de los más sensibles, seguido por *Aspergillus* y *Penicillium*. Se ha referido además que los polifenoles inhiben el crecimiento de los microorganismos al formar complejos con sus enzimas y proteínas y pueden llegar a disolver la membrana microbiana o la pared. Así, los polifenoles pueden penetrar en la célula, donde interactúan y alteran la barrera de permeabilidad selectiva de las estructuras de la membrana microbiana (Daglia, 2012; Sikkema, De Bont, y Poolman, 1994). Este hecho es particularmente interesante, ya que el género *Fusarium* se considera uno de los agentes responsables de producir enfermedades en los plátanos (Nel, Steinberg, Labuschagne, y Viljoen, 2007). En este sentido, el uso de compuestos antimicrobianos naturales, tales como el AE de citronela, puede ser una alternativa viable para evitar la proliferación de algunos hongos responsables del deterioro de los alimentos.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana cualitativa de las películas SL y SLC.

Almacenamiento	Muestra	Microorganismos		
		<i>F. oxysporum</i>	<i>P. expansum</i>	<i>D. hansenii</i>
58% HR	SL	-	-	-
58% HR	3 días	++	+	-
	1 mes	++	+	-
	3 meses	++	+	-
	6 meses	+	+	-
Ambientales (EC)	1 mes	++	-	-
	3 meses	++	-	-
	6 meses	+	-	-

++: inhibidos; +: ligeramente inhibido; -: sin inhibición

Ensayo en plátanos

Las películas SL y SLC se utilizaron a modo de envoltorios para determinar su efecto durante el almacenamiento de plátanos (*Musa acuminata* Colla) (Fig. 3). La aplicación de películas que contienen AE (SLC) redujo el número de mohos y levaduras y microorganismos mesófilos aerobios viables ($p \leq 0,05$) (Fig. 3). El efecto antimicrobiano fue mayor al final del experimento (día 6), donde los valores se situaron por debajo de 1,0 log UFC/g (mohos y levaduras) y 4,3 log UFC/g (mesófilos).

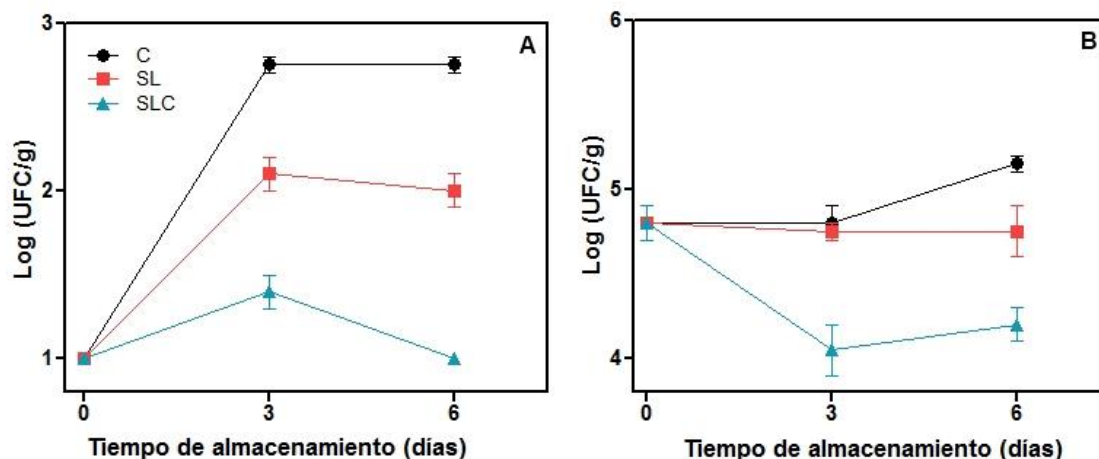


Figura 3. Recuento de mohos y levaduras (A) y mesófilos aerobios viables (B) durante el ensayo en plátanos (*Musa acuminata* Colla) recubiertos con películas de proteína de soja reticulada y lignina (SL) incorporadas con aceite esencial de citronela (SLC) y sin recubrimiento (Control, C).

Aunque las películas se perforaron, su aplicación en sí misma puede influir en el crecimiento microbiano independientemente de su composición, dado que pueden reducir la transferencia de gases y la tasa de permeabilidad al oxígeno, modificando así las emisiones de etileno. Las películas de proteína, especialmente las reticuladas, reducen la permeabilidad al oxígeno (Miller y Krochta, 1997). Esto podría explicar por qué los recuentos en los plátanos cubiertos con la película (sin AE) son menores que los del control (aire). Además, los aceites esenciales (como citronela y otros), en la fase de vapor, inhiben el crecimiento micelar, según observan Passone, Girardi, y Etcheverry (2013) y Sellamuthu, Sivakumar, y Soundy (2013). Durante el ensayo, la actividad de inhibición de la película SLC se observó tanto en el ensayo de conservación del plátano como en el ensayo *in vitro*. A partir de los resultados de GC-MS, se puede estimar que la concentración de citronelal y geraniol (alrededor de 6,83 y 6,02 mg/mL de aire, respectivamente) en las películas fue suficiente para reducir el crecimiento microbiano (Fig 2). Sellamuthu *et al.*, (2013) observaron que aumentando las concentraciones de los vapores de AE de tomillo, menta y citronela (1-5 µL/placa de Petri), se produce una inhibición gradual del crecimiento de los patógenos postcosecha. Asimismo, otros investigadores testaron 14 aceites esenciales (como la corteza de canela, citronela, tomillo, etc.) y observaron la inhibición de seis cepas de microorganismos patógenos (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*) con concentraciones por debajo de 12,5 mg/L de aire (Inouye, Takizawa, y Yamaguchi, 2001). Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo; con la formulación utilizada en

las películas SLC, los microorganismos se inhibieron con concentraciones más bajas a las ya mencionadas, probablemente debido a la inherente actividad del AE y a la proporción e interacción de sus componentes (Fig 3)(Tabla 3).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se relaciona con la concentración, proporción y tipo de compuestos fenólicos (Ncube, Afolayan, y Okoh, 2008). Además, el citronelal y el geraniol se describen como compuestos con capacidad antimicrobiana, antifúngica e insecticida (Singh y Maurya 2005). En este contexto, Arancibia *et al.*, (2013) observaron que el AE de citronela incorporado en las películas de SPI-lignina altera el comportamiento de las moscas *Ceratitis capitata*. Así, la aplicación de películas de AE de citronela en plátanos potencialmente ofrece una doble ventaja debido a sus propiedades insecticidas y antimicrobianas, lo que hace que estas películas sean particularmente prometedoras para su uso en agronomía.

Cambios de color durante el almacenamiento

Durante el ensayo de los plátanos se evaluaron los cambios en la coloración de la piel, que cambia de verde a amarillo. Éste hecho se reflejó en un aumento en los valores de L^* , a^* y b^* , lo que coincide con descrito por (Chen y Ramaswamy, 2002). Los resultados muestran que hubo un ligero aumento en los valores de L^* en los plátanos en comparación con los cubiertos con las películas SL y SLC (Fig. 4). El valor de a^* en los plátanos con las películas SLC fue el más bajo hasta el día 6., valores que fueron 5 veces mayor en los plátanos control y I en los cubiertos con SL. Al final del período estudiado, los valores b^* aumentaron rápidamente con la película de SL y fueron similares a los del control ($b^* \sim 68$). Por otro lado, los plátanos cubiertos con las películas SLC se mantuvieron alrededor de $b^* = 70$. Estos valores son superiores a los descritos por Chen y Ramaswamy, (2002) en plátanos *Musa acuminata* Colla AAA ($b^* 35-40$). Tzortzakakis (2007) evaluó la calidad postcosecha de fresa y tomate bajo vapores de AE de eucalipto y canela y sugirió que el vapor de los aceites esenciales pueden mejorar los atributos relacionados con la calidad de fruta por la bien documentada protección antimicrobiana durante el transporte y almacenaje del producto fresco.

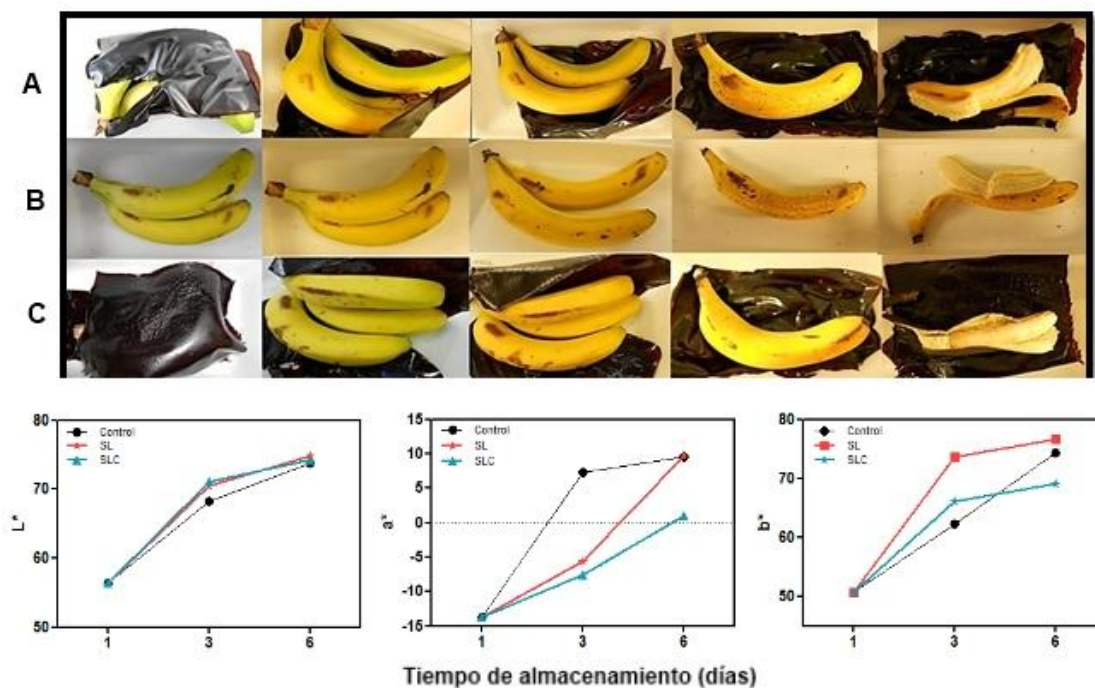


Figura 4. Cambios de color visible (figura superior) y cambios en los parámetros L^* , a^* y b^* (figura inferior) durante el ensayo de plátanos (*Musa acuminata* Colla). A) Plátanos recubiertos con la película bicapa SL, B) control sin película y C) película bicapa con AE de citronela (SLC).

Análisis sensorial

Desde el punto de vista sensorial no hubo diferencias entre los plátanos control y los recubiertos con películas. Al final del ensayo (día 6) (Fig. 4 a, b, c), los panelistas no fueron capaces de detectar la presencia del AE de citronela. Esto demuestra que las películas bicapa son una barrera eficaz al aroma del AE, según describe Priolo, Gamboa, Holder, y Grunlan (2010). En el presente estudio, la película SLC generó una atmósfera protectora frente a los microorganismos sin provocar cambios detectables en las propiedades organolépticas.

Biodegradación

Durante el ensayo, las películas con aceite esencial (previamente acondicionadas al 58% HR durante 1, 3 o 6 meses) se dejaron en el suelo durante 30 días, expuestas a las condiciones atmosféricas. En todos los casos, después de 1 mes de exposición a la degradación en el suelo, estas películas presentaron cambios claramente visibles y la superficie se volvió más arrugadas e irregulares (Fig. 5).

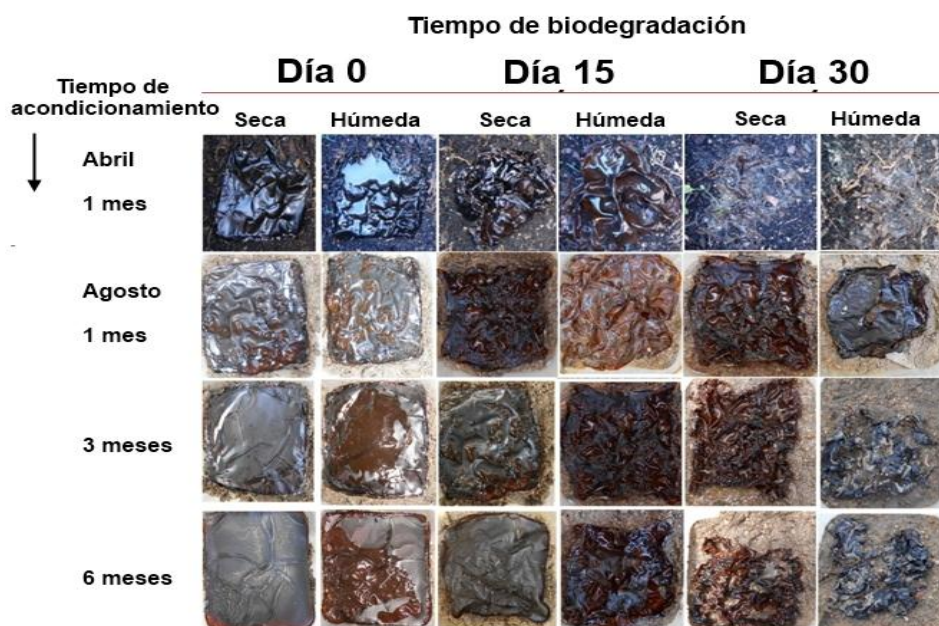


Figura 5. Apariencia de las películas SLC durante el ensayo de biodegradación después del acondicionamiento a 58% HR durante 1, 3 y 6 meses.

Los cambios sufridos en las películas con un largo periodo de acondicionamiento (3 ó 6 meses) fueron mayores. Por ejemplo, la rugosidad fue más pronunciada y también las modificaciones en la superficie de las películas, especialmente en las almacenadas durante 6 meses. González *et al.*, (2011) observaron que la degradación de las películas de SPI-genipina en el suelo depende en gran medida del grado de reticulación. Un bajo grado de reticulación permite una rápida biodegradación (Dalev *et al.*, 2000). El efecto de la reticulación y la red proteica de la SPI pueden haber disminuido en parte por factores ambientales, como el agua y los microorganismos. La evaluación macroscópica reveló que las películas acondicionadas durante largos períodos de tiempo fueron más susceptibles a la degradación que las almacenadas durante menos tiempo. Las películas expuestas a condiciones ambientales fueron muy frágiles, posiblemente por la progresiva cristalización durante el acondicionamiento y posterior biodegradación en el suelo. En cualquier caso, todas las muestras conservaron su color marrón característico y podrían considerarse películas biodegradables en corto espacio de tiempo. Dalev *et al.*, (2000) y González *et al.*, (2011) obtienen resultados similares en películas biodegradables con SPI y gelatina reticulada, respectivamente. En el presente trabajo, cuando la película se humedeció periódicamente con agua simulando llovizna, el tamaño se redujo y es posible incluso que perdiera algunos compuestos solubles, incluyendo el glicerol (plastificante), lo a través de un efecto de lavado, como se menciona en la sección de FTIR.

Pérdida de peso

Al final del experimento, las películas acondicionadas durante 1 mes (agosto) al 58% RH mostraron una pérdida de peso de aproximadamente $30,87 \pm 0,22\%$. Estos resultados fueron similares ($p \geq 0,05$) a los obtenidos con las películas acondicionadas durante 3 meses ($30,45 \pm 0,42\%$) y 6 meses ($30,25 \pm 0,38\%$). La pérdida de peso podría estar relacionada con el grado de reticulación, pérdida de materiales solubles en agua o de compuestos de bajo peso molecular, como el glicerol, y la actividad microbiana, especialmente por la degradación enzimática. Este comportamiento también fue descrito en películas de SPI sin reticulación (pérdida de peso entre el 50 y el 90%) (Lodha y Netravali, 2005) y películas multicapa de gelatina reticulada con cerca del 30% de pérdida de peso (Martucci y Ruseckaite 2009). En el presente trabajo, el AE de citronela también podría haberse liberado de la matriz de la película. Este tipo de comportamiento se ha observado previamente en películas de proteína con AE de clavo, donde el eugenol se liberó de la matriz (Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca, y Montero, 2012).

Conclusiones

Las películas de proteína reticulada de soja, lignina y aceite esencial de citronela mostraron buenas propiedades antimicrobianas, de barrera al agua y a la luz UV y por lo tanto podrían utilizarse como material protector en agronomía. Asimismo, ya que son totalmente biodegradables, este envase puede también dejarse en el suelo, evitando de este modo el coste de la recolección o reciclado.

Bibliografía

- AEMET. (2013). Resumen de variables meteorológicas. Agencia Estatal de Meteorología. www.aemet.es [Consulta: sábado, 19 de octubre de 2013]
- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry. In. Maryland, USA
- Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Repellency effect of forty-one essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex mosquitoes. *Parasitology Research*, 99(4), 478-490.
- Andoğan, B., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., & Mumcu, E. (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 860-864.
- Aoudou, Y., Léopold, T. N., Michel, J. D. P., Xavier, E. F., & Moses, M. C. (2010). Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1, 1-8.
- Arancibia, M., Rabossi, A., Boichichio, P. A., Moreno, S., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. d. C., & Montero, P. (2013). Biodegradable Films Containing Clove or Citronella Essential Oils against the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Agriculture and Food Technology*, 3(3), 1-7.

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

- Austin, A. T., & Ballaré, C. L. (2010). Dual role of lignin in plant litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4618-4622.
- Blanco-Pascual, N., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37(0), 100-110.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, M. P. (2013). Effect of different protein extracts from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 118-131.
- Brown, M., & Hebert, A. A. (1997). Insect repellents: An overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 36(2), 243-249.
- Chang, M. C., & Tanaka, J. (2002). FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*, 23(24), 4811-4818.
- Chen, C. R., & Ramaswamy, H. S. (2002). Color and Texture Change Kinetics in Ripening Bananas. *LWT - Food Science and Technology*, 35(5), 415-419.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dalev, P. G., Patil, R. D., Mark, J. E., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. *Journal of Applied Polymer Science*, 78(7), 1341-1347.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- Fallik, E., Temkin-Gorodeiski, N., Grinberg, S., & Davidson, H. (1995). Prolonged low-temperature storage of eggplants in polyethylene bags. *Postharvest Biology and Technology*, 5(1-2), 83-89.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Godefroot, M., Sandra, P., & Verzele, M. (1981). New method for quantitative essential oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 203, 325-335.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- González, A., Strumia, M. C., & Alvarez Igarzabal, C. I. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering*, 106(4), 331-338.
- Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Handa, K., Nakatsubo, F., & Yano, H. (2007). Surface Modification of Bacterial Cellulose Nanofibers for Property Enhancement of Optically Transparent Composites: Dependence on Acetyl-Group DS. *Biomacromolecules*, 8(6), 1973-1978.
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- Li, Y.-Q. (2012). Structure Changes of Soybean Protein Isolates by Pulsed Electric Fields. *Physics Procedia*, 33, 132-137.
- Licciardello, F., Muratore, G., Suma, P., Russo, A., & Nerín, C. (2013). Effectiveness of a novel insect-repellent food packaging incorporating essential oils against the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 173-180.
- Lodha, P., & Netravali, A. N. (2005). Effect of soy protein isolate resin modifications on their biodegradation in a compost medium. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 465-477.

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 94(8), 1307-1313.
- Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 228-237.
- Moraes, R., Elfvendahl, S., Kylin, H., & Molander, S. (2003). Pesticide residues in rivers of a Brazilian rain forest reserve: Assessing potential concern for effects on aquatic life and human health. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(4), 258-263.
- Nakahara, K., Alzoreky, N. S., Yoshihashi, T., Nguyen, H. T., & Trakoontivakorn, G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37(4), 249-252.
- Ncube, N., Afolayan, A., & Okoh, A. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797-1806.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4), 697-705.
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 163-172.
- Park, S. K., Bae, D. H., & Rhee, K. C. (2000). Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(8), 879-884.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., & Etcheverry, M. (2013). Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 434-444.
- Patil, R. D., Dalev, P. G., Mark, J. E., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters. *Journal of Applied Polymer Science*, 76(1), 29-37.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., & Kole, C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, 86(349), 237-246.
- Priolo, M. A., Gamboa, D., Holder, K. M., & Grunlan, J. C. (2010). Super Gas Barrier of Transparent Polymer-Clay Multilayer Ultrathin Films. *Nano Letters*, 10(12), 4970-4974.
- Rhim, J.-W., Mohanty, K. A., Singh, S. P., & Ng, P. K. W. (2006). Preparation and Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Soy Protein Isolate and Poly(lactide). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3059-3066.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2000). Solubility, Tensile, and Color Properties of Modified Soy Protein Isolate Films†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4937-4941.
- Richert, L., Boulmedais, F., Lavallo, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., & Picart, C. (2003). Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules*, 5(2), 284-294.
- Rizzarelli, P., Puglisi, C., & Montaudo, G. (2004). Soil burial and enzymatic degradation in solution of aliphatic co-polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, 85(2), 855-863.
- Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Egging, S. B., & Teranishi, R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(3), 446-449.
- Sellamuthu, P. S., Sivakumar, D., & Soundy, P. (2013). Antifungal Activity and Chemical Composition of Thyme, Peppermint and Citronella Oils in Vapor Phase against Avocado and Peach Postharvest Pathogens. *Journal of Food Safety*, 33(1), 86-93.
- Sikkema, J., De Bont, J., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022-8028.

Capítulo 8. Liberación de compuestos volátiles y biodegradación de películas activas de proteína de soja y con lignina con la adición de aceite esencial de citronela

- Singh, G., & Maurya, S. (2005). Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils: an overview. *Natural Product Radiance*, 4, 179-192.
- Soliman, E. A., Tawfik, M. S., Hosni, E., & Moharram, Y. G. (2007). Preparation and characterization of soy protein based edible/biodegradable films. *American Journal of Food Technology*, 2(6), 462-476.
- Songkro, S., Hayook, N., Jaisawang, J., Maneenuan, D., Chuchome, T., & Kaewnopparat, N. (2012). Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 72(3-4), 339-355.
- Thorsell, W., Mikiver, A., Malander, I., & Tunón, H. (1998). Efficacy of plant extracts and oils as mosquito repellents. *Phytomedicine*, 5(4), 311-323.
- Tzortzakis, N. G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 111-116.
- UNE 87-006-92. (1992). Prueba Triangular. In Análisis sensorial. Metodología. Madrid, Spain: Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR)
- Van de Velde, K., & Kiekens, P. (2002). Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*, 21(4), 433-442.
- Watkins, C. B., & Thompson, C. J. (1992). An evaluation of microperforated polyethylene film bags for storage of 'Cox's Orange Pippin' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 2(2), 89-100.
- Wu, R.-L., Wang, X.-L., Li, F., Li, H.-Z., & Wang, Y.-Z. (2009). Green composite films prepared from cellulose, starch and lignin in room-temperature ionic liquid. *Bioresource Technology*, 100(9), 2569-2574

VII. Discusión general

En los últimos años se ha desarrollado un gran interés por valorizar residuos y productos infrautilizados de la agroindustria. Como ejemplo, en el sector agrícola solo 20 cultivos ocupan el 82% de la superficie agrícola total, mientras que otros 117 se cultivan en el 18% restante (Fig. 1), lo que implica la infrautilización de cultivos y la degradación del ecosistema.

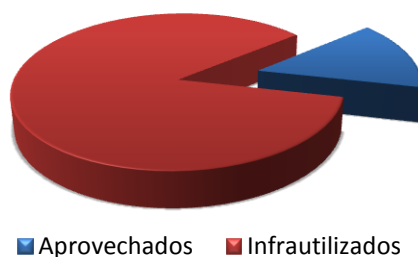


Figura 1. Relación de cultivos agrícolas aprovechados e infrautilizados de la superficie agrícola total.

Por otro lado, la industrialización y comercialización de productos de la pesca, entre otros los crustáceos, (unos de los más consumidos son los langostinos, en especial los géneros *Penaeus* sp., y *Litopenaeus* sp.) constituyen una fuente importante de recursos para países del Sudeste Asiático, América e Islas del Pacífico (FAO, 2012), que a su vez supone un enorme problema medioambiental debido a los residuos generados por las industrias tras la extracción de la parte comestible. Los residuos de la acuicultura se tratan y acumulan como basura cuando no se utilizan como alimento para animales (Coward-Kelly, Agbogbo, y Holtzapple, 2006; Oliveira Cavalheiro, Oliveira de Souza, y Bora, 2007; Westendorf, 2000), o bien terminan en pozos sépticos o en el alcantarillado, representando un serio problema de impacto ambiental negativo. El aprovechamiento de los recursos infrautilizados y la valorización de residuos constituyen una oportunidad de desarrollo industrial y a la vez una solución inteligente para el problema medioambiental que generan.

En la presente Memoria se han utilizado dos fuentes de materias primas para la elaboración de recubrimientos activos (películas y coberturas) aplicables en el campo de la agroalimentación: las procedentes de residuos de la agroindustria y las de recursos infrautilizados. Entre los numerosos residuos generados por la agroindustria se seleccionaron las cabezas y exoesqueletos de langostino, y como productos agrícolas infrautilizados agar, alginato, proteína de aislado de soja y los aceites esenciales (canela, citronela y clavo).

De la valorización integral de los residuos de langostinos mediante extracciones acuosas leves e hidrólisis enzimáticas amigables con el medioambiente se recuperó material con alto valor biológico como caroteno-proteínas, hidrolizados proteicos, lípidos y carotenoides, quitina y quitosano. Los recursos infrautilizados, tanto los polímeros (agar, alginato, proteína de soja) como los aceites esenciales, se utilizaron para desarrollar películas (en mono o bicapa) y coberturas activas y biodegradables, que se caracterizaron y se evaluó su potencial aplicación en agroalimentación.

La discusión general se divide en cinco secciones acorde con los objetivos planteados, con el fin de proporcionar un enfoque específico de la investigación realizada.

VALORIZACIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA INDUSTRIA PROCESADORA DE CRUSTÁCEOS Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL POLIMÉRICO Y ACTIVO, PRINCIPALMENTE QUITOSANO, PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y CAROTENOIDES, MEDIANTE MÉTODOS RESPETUOSOS CON EL MEDIO AMBIENTE Y MANTENIENDO SU FUNCIONALIDAD

En la actualidad existe un gran interés por encontrar alternativas a la utilización de residuos de la industria de crustáceos. En el langostino, cerca del 40-50% del peso total lo constituyen residuos sólidos altamente perecederos que son fuente de proteína (35-40%), quitina (10-15%), minerales (10-15%) y carotenoides (Sachindra, Bhaskar, y Mahendrakar, 2005), y que a su vez producen una gran contaminación ambiental. Por este motivo, uno de los objetivos fue estudiar la obtención de material activo a partir de residuos de estos crustáceos. Los residuos en la industria transformadora de crustáceos son múltiples, y el presente trabajo se centró en la obtención de extractos ricos en proteínas y caroteno-proteínas (procedente del cefalotórax y de la cutícula) y quitina para transformarla en quitosano, materiales todos ellos abundantes en las plantas de procesado de langostino.

La industria de crustáceos podría optimizar la transformación de los residuos con la utilización no solo de la quitina sino también de las proteínas y otros compuestos presentes en los residuos (Barros, Bello, Bao, y Torrado, 2009; De Holanda y Netto, 2006; Gagne y Simpson, 1993; Gildberg y Stenberg, 2001). La quitina y su derivado desacetilado, el quitosano, tienen propiedades únicas que hacen de ellos materiales útiles y adecuados para gran variedad de aplicaciones, algunas de gran importancia (Muzzarelli y Peter, 1997; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). A pesar de ello se continúa produciendo de manera tradicional, lo que implica un gran consumo de reactivos químicos.

■ **Aplicación de métodos químicos para la obtención de quitosano**

La obtención de quitina involucra una serie de etapas como la desmineralización y desproteínización y posteriormente la desacetilación, para dar lugar al quitosano (Gagne *et al.*, 1993; Nessa *et al.*, 2010; No, Meyers, y Lee, 1989). Estas etapas son necesarias para acceder a la quitina, que se encuentra a modo de fibras en una estructura en panal, que contiene carbonato de calcio (responsables de la dureza del exoesqueleto) y un complejo caroteno-proteína-quitina (Fig. 2) (Fabritius *et al.*, 2011). Generalmente, la desmineralización o eliminación del carbonato cálcico de los caparazones y exoesqueletos se lleva a cabo con ácidos inorgánicos y orgánicos, principalmente acético, clorhídrico, sulfúrico, entre otros

(Mahmoud, Ghaly, y Arab, 2007; Shahidi y Abuzaytoun, 2005). Por otra parte, la desproteinización se realiza con sosa (NaOH) a concentraciones bajas (0,5% p/p) y en dos o tres etapas sucesivas. Los extractos procedentes de este proceso contienen proteínas y productos de degradación de las mismas; una vez eliminado el carbonato de calcio y la proteína, la quitina queda libre (Fig. 2).

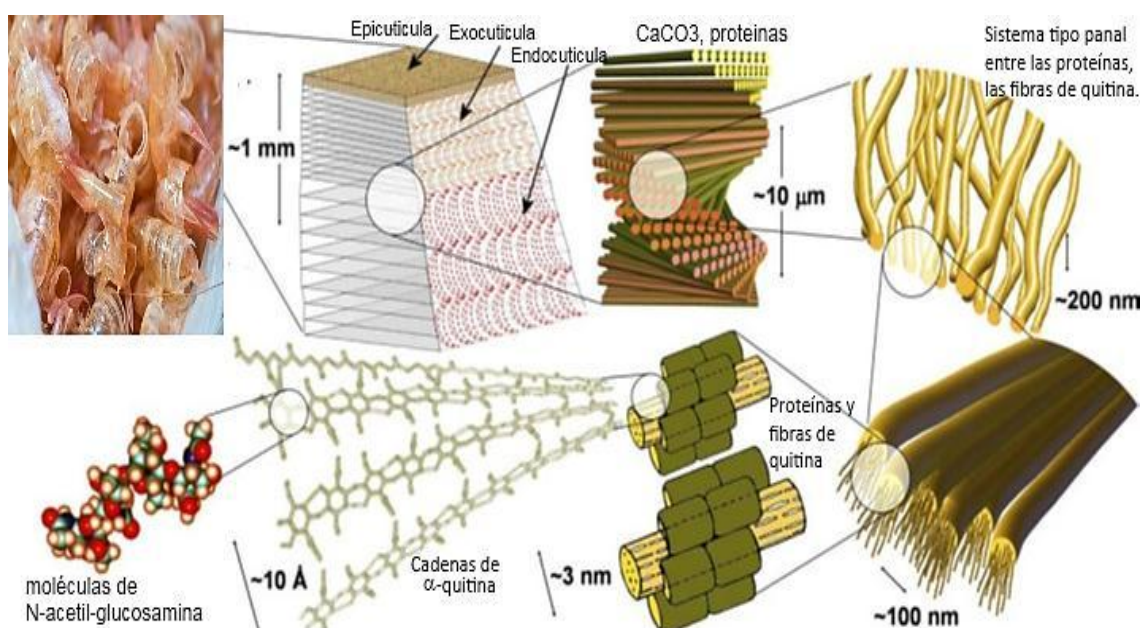


Figura 2. Microestructura de la cutícula de los exoesqueletos de crustáceos, adaptado de Nikolov *et al.*, (2010).

No existe un método estándar de obtención de quitosano. La desacetilación se lleva a cabo por lo general con NaOH a elevadas concentraciones (40-50% p/v) y el proceso es dependiente de la concentración, temperatura y tiempo de reacción (Muzzarelli y Peter, 1997; Nessa *et al.*, 2010; No y Meyers, 1995). Si bien en la literatura la obtención de quitosano está ampliamente discutida, poco se conoce sobre su obtención eliminando la etapa de desproteinización (Lalaleo, 2010; Alvarado *et al.*, 2007). En este sentido, y con la finalidad de caracterizar el quitosano obtenido de una forma más económica y rápida, en el presente estudio se suprimió esta etapa. Además, en base a que la desacetilación puede provocar la depolimerización de la quitina, se adicionó un agente reductor (NaBH₄) en 2 y 4 h de desacetilación (Tabla 1). Con anterioridad se han utilizado agentes reductores durante la desacetilación de la quitina (Dung, Milas, Rinaudo, y Desbrières, 1994); sin embargo se conoce muy poco sobre su aplicación tras la obtención directa de quitosano.

Tabla 1. Combinación de factores utilizados para la obtención de quitosano

Quitosano	Paso por Quitina	Agente reductor NaBH ₄	Tiempo h
ChQ2	Q		2
ChQ4	Q		4
ChQR2	Q	R	2
ChQR4	Q	R	4
Ch2	-		2
Ch4	-		4
ChR2	-	R	2
ChR4	-	R	4

Los ocho quitosanos así obtenidos presentaron un peso molecular similar a los observados por Lalaleo (2010), mientras que el grado de desacetilación ($GD > 70\%$) fue mayor en todos los casos, incluso en los obtenidos sin pasar por la etapa de quitina (Fig. 3). Este hecho podría atribuirse a la especie utilizada durante el proceso. El grado de desacetilación tiene un considerable efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y solubilidad del quitosano, que también afecta a la morfología de la cadena polimérica, peso molecular, biodegradabilidad y a las aplicaciones y actividad biológica del mismo (Di Martino, Sittinger, y Risbud, 2005; Knorr, 1982).



Figura 3. Esquema de la obtención de quitosano a través de la etapa por quitina y sin la obtención previa de quitina.

La eliminación de la etapa de obtención de quitina permite obtener quitosanos con alto grado de desacetilación (Fig. 4A) -incluso a las dos horas - (Ch2, ChR2), comparables a los del método

tradicional (ChQ2 y ChQR2). El agente reductor protegió la cadena polimérica dando como resultado pesos moleculares (kDa) ligeramente superiores (Fig. 4B), especialmente cuando se desacetiló durante menos tiempo (ChQ2 vs. ChQR2). La eliminación de la etapa de obtención de quitina parece afectar más al peso molecular que al grado de desacetilación, por lo que cada quitosano presentó propiedades fisicoquímicas y posibles aplicaciones diferentes. Un aspecto negativo de esta metodología es que con NaOH a alta fuerza iónica, se destruye la proteína, con la consiguiente pérdida de rendimiento y la generación de residuos con alto contenido en químicos.

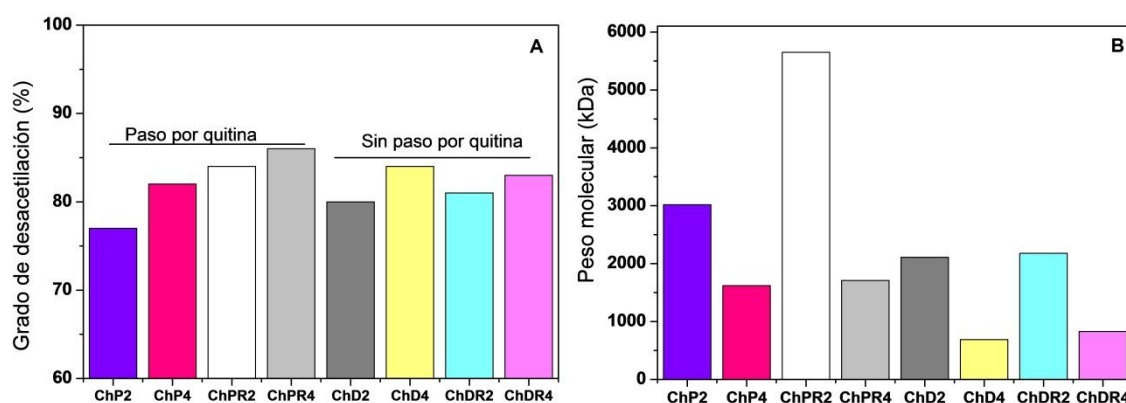


Figura 4. Grado de desacetilación (A) y peso molecular (B) de los quitosanos obtenidos.

■ Aplicación de métodos enzimáticos para la obtención de material funcional y biopolímeros de cefalotórax y cutícula

Tradicionalmente el quitosano ha sido básicamente el material recuperado a partir de los residuos de crustáceos. El resto (proteínas, minerales, pigmentos, etc.) constituye un nuevo residuo que a lo sumo se utiliza como parte de la formulación de piensos para alimentación animal. Si bien el método químico tradicional, con o sin la etapa de quitina, permite la obtención de quitosanos con alto grado de desacetilación y adecuada funcionalidad, la actual preocupación por el cuidado del medio ambiente y la búsqueda por procesos menos agresivos y rentables, hizo que se planteara un nuevo método de obtención de quitosano. El método propuesto conlleva la recuperación de quitina y simultáneamente proteína y carotenoides en las distintas etapas de la extracción. La extracción se planteó de manera que los concentrados proteicos pudieran ser utilizados como aditivos o ingredientes para el consumo humano, por lo que se cuidó y minimizó el uso de productos químicos.

Las cabezas y exoesqueletos se sometieron a una hidrólisis previa (Fig. 5), ya que la extracción de las caroteno-proteínas aumenta cuando el producto sufre con anterioridad un tratamiento térmico o una hidrólisis enzimática (Armenta-López, Guerrero, y Huerta, 2002). Posteriormente, las caroteno-proteínas se sometieron a extracciones y separaciones sucesivas a fin de obtener el máximo rendimiento. Los materiales obtenidos fueron extracto de carotenoides (CE); concentrados ricos en proteínas y lípidos procedentes de la fase intermedia (PCc) o del lavado de material quitinoso (PCw) e hidrolizados recuperados durante la desproteinización de la quitina con alcalasa y viscozyme (HPch) o después de la hidrólisis de PCc con alcalasa (HPc). La quitina aislada se desacetiló con 40% o 10% p/v de NaOH para dar lugar a los quitosanos Ch40 y Ch10, respectivamente.

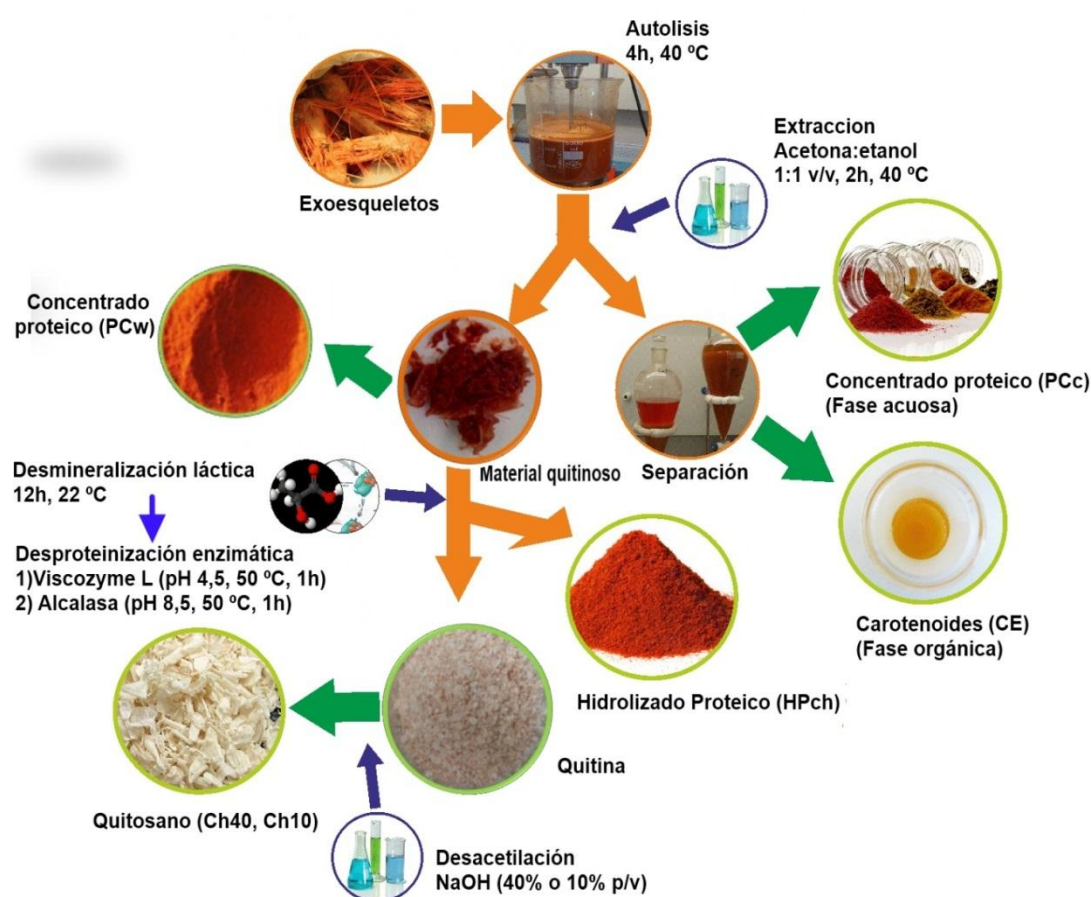


Figura 5. Esquema del aprovechamiento integral de residuos de langostino para la obtención de material funcional y biopolímeros.

Los concentrados e hidrolizados proteicos obtenidos presentaron alto contenido de proteínas, lípidos, minerales y carbohidratos. El rendimiento y la composición química proximal se muestran en la Figura 6. El complejo caroteno-proteína fue evidente en todos los

concentrados e hidrolizados proteicos obtenidos. El contenido de astaxantina en el extracto de carotenoides (CE) fue de 60 mg/kg de residuo húmedo, en el concentrado proteico de la fase intermedia (PCc) fue de 6,1g/100g (base seca, b.s.) y en el hidrolizado (HPc) de 2,7g/100g (b.s). El contenido de minerales de los tres materiales fue alto (Fig. 6), entre ellos destacan el calcio y el magnesio, cuyo contenido fue mayor en PCc que en PCw y HPch (Tabla 2, Capítulo 2).

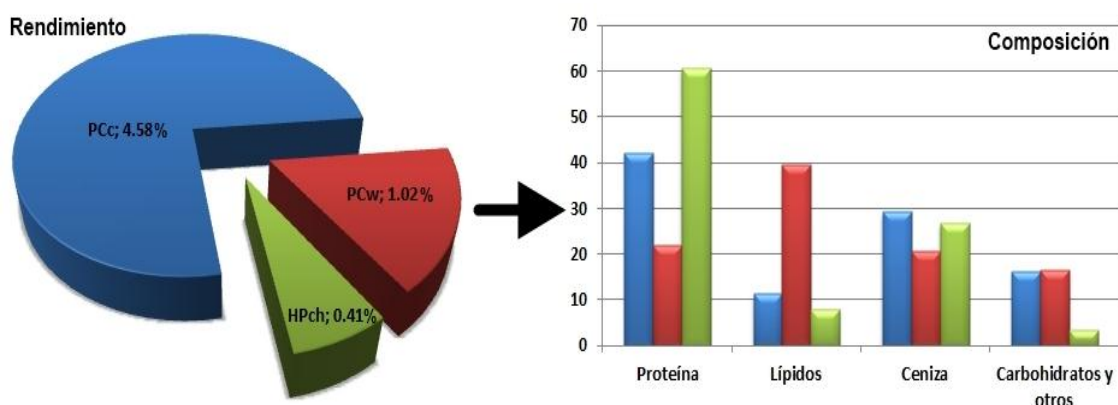


Figura 6. Rendimiento (%) y composición proximal del material obtenido a partir de residuos de *L. vannamei*: concentrado proteico de la fase intermedia (PCc), concentrado proteico del material quitinoso (PCw) e hidrolizado obtenido durante la etapa de desproteización (HPch)

Por otro lado, los concentrados proteicos e hidrolizados fueron una excelente fuente de aminoácidos esenciales como Asp, Glu y Gly que en conjunto representan entre el 41-45 % de la composición total. También se encontraron niveles considerables de taurina en PCc y PCw (0,72 y 0,56 g/kg, respectivamente). La taurina es un ácido orgánico natural con importantes funciones biológicas, ya que ayuda a mantener la integridad estructural y funcional de las células cerebrales y retinales por sus propiedades neuroprotectoras, detoxificante y antioxidante, entre otras (Militante y Lombardini, 2002).

Con respecto a la actividad antioxidante, tanto los concentrados proteicos como los hidrolizados y el extracto de carotenoides presentaron gran actividad antioxidante, de manera especial CE (~17 veces superior que en HPc y PCc). La actividad antioxidante en el concentrado proteico puede estar asociada a la presencia de azúcares reductores y carotenoides, particularmente astaxantina (Liñán-Cabello, Paniagua-Michel, y Hopkins, 2002). La actividad antioxidante y la apariencia de los extractos activos obtenidos se muestran en la Figura 7.

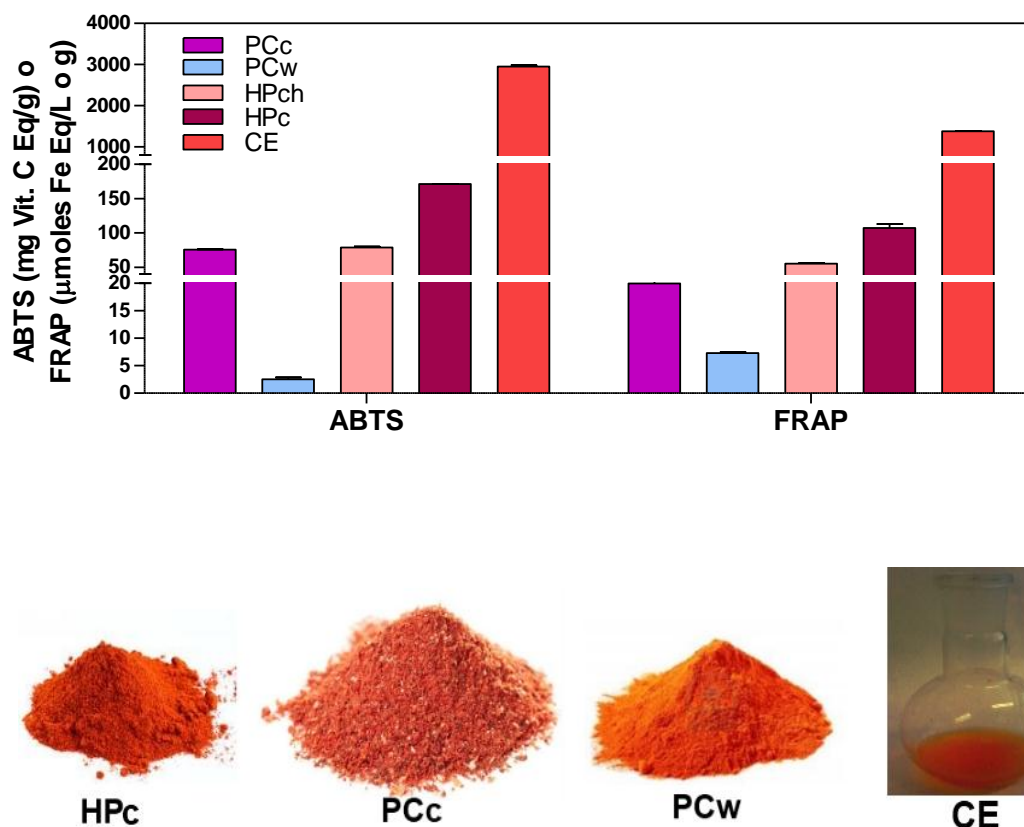


Figura 7. Actividad antioxidante (ABTS Y FRAP) y apariencia de los hidrolizados proteicos, concentrados proteicos y extracto de carotenoides obtenidos a partir de los residuos de *L. vannamei*.

A diferencia del método tradicional, en el que se utiliza ácido clorhídrico, en el presente trabajo el sólido quitinoso se sometió a una desmineralización con ácido láctico (75,6 g/l). El ácido láctico se puede producir *in situ* a bajo coste a partir de sub-productos como el suero, lignocelulosa o almidón (Bautista *et al.*, 2001). La desproteización enzimática se llevó a cabo con las enzimas Alcalasa® y Viscozyme L®. La utilización de alcalasa para la obtención de quitina se ha descrito con anterioridad, es una enzima alcalina con actividad endo y exopeptidasa (Synowiecki y Al-Khateeb, 2000). Sin embargo, se desconoce el uso de viscozyme, cuya clave reside principalmente en la actividad endo-β glucanasa, que hidroliza las uniones β (1,3) o (1,4) de los D-glucanos. Por tanto, la enzima viscozyme puede hidrolizar eficazmente polisacáridos de la pared celular y favorecer la escisión de los enlaces dentro de la matriz, lo que permite liberar los constituyentes intercelulares como la proteína (Guan y Yao, 2008). Los altos rendimientos de proteína (~ 60%) y lípidos (Fig. 6) están íntimamente ligados al método de desproteización aplicado (Fig. 5), lo que confirma que la utilización de ambas

enzimas permiten obtener un buen rendimiento en material proteico, lípidos y minerales. Si bien el material proteico está parcialmente hidrolizado y no es funcional para muchos propósitos como biopolímero, sí lo es para otros, como por ejemplo su potencial bioactivo (Fig. 8).



Figura 8. Aspecto de: **A)** material quitinoso, **B)** hidrolizado proteico (HPch) recuperado durante la obtención de quitina, **C)** quitina.

● Desacetilación de la quitina por métodos químicos suaves

Una vez separada la quitina (material muy insoluble) se procedió a transformarla en quitosano. Este hecho condujo a la búsqueda de métodos de desacetilación que por su menor consumo de reactivos químicos permitieran obtener un quitosano con buenas propiedades. Como primer paso se disminuyó la concentración de NaOH, con reducciones del 20 y 80% en peso. Sin embargo, al disminuir la concentración fue necesario incrementar el tiempo de reacción durante el proceso. El grado de desacetilación obtenido para cada quitosano fue alto, >70% (Tabla 2). Los dos quitosanos obtenidos fueron muy solubles en medio ácido y aptos como material base para la elaboración de recubrimientos. Asimismo existieron diferencias en el grado de desacetilación, que fue mayor cuando se utilizó soluciones acuosas con una mayor concentración de NaOH (Ch40: 84% GD, 40% p/v de NaOH) que con la menor concentración (Ch10: 74% GD, 10% p/v de NaOH). El tamaño de partícula (granulometría) también se vio afectado (Fig. 9). El quitosano sometido a un proceso de desacetilación más largo, a pesar de utilizar una menor concentración de álcali, fue más pequeño en tamaño de partícula a simple vista.

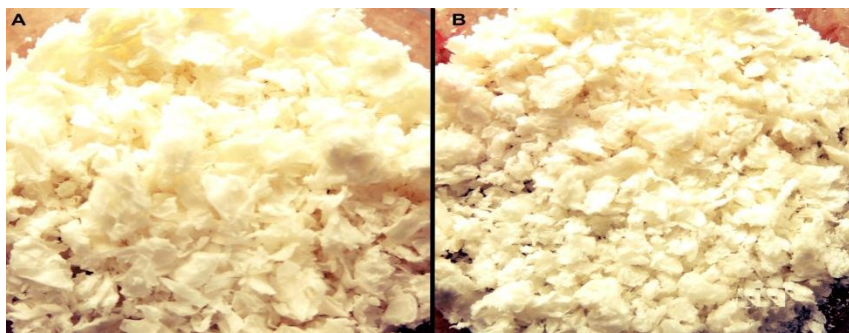


Figura 9. Apariencia de: **A)** quitosano obtenido con 40% (p/v) NaOH (Ch40) y **B)** quitosano obtenido con 10%(p/v) NaOH (Ch10).

● Desacetilación de quitina por métodos biológicos.

En la búsqueda de un método que implique un menor gasto de reactivos, otra alternativa ensayada para la desacetilación de la quitina fue la aplicación de un método biológico. En este caso se utilizaron extractos crudos enzimáticos de quitina-desacetilasa obtenida a partir de los mohos *Mucor rouxii* y *Colletotrichum Lindemuthianum* (Beaney, Gan, Magee, Healy, y Lizardi-Mendoza, 2007; Zhao, Park, y Muzzarelli, 2010). La enzima en *M. rouxii* es intracelular mientras que en *C. Lindemuthianum* es extracelular (Zhao *et al.*, 2010). La quitina-desacetilasa (cataliza la desacetilación de la quitina), reconoce una secuencia de cuatro unidades de N-acetilglucosamina en el sustrato, una de las cuales somete a desacetilación; el quitosano resultante tiene un patrón de desacetilación más uniforme que aquel obtenido con NaOH (Fig. 10).

Sin embargo, la quitina pura es un sustrato pobre, por lo cual y para facilitar la acción de la enzima debe ser depolimerizada (Zhao *et al.*, 2010). Este proceso se realizó con diversos tratamientos, entre los que se incluyen ácido clorhídrico, metanol, ácido fórmico, etc. A pesar de ello, el proceso no fue suficiente efectivo como para obtener quitosanos con un alto grado de desacetilación (Tabla 2). Otros autores también obtienen bajo grado de desacetilación al trabajar con la enzima quitina-desacetilasa sobre un sustrato de quitina (Beaney, Gan, Magee, Healy, y Lizardi-Mendoza, 2007; Win y Stevens, 2001). Depolimerizar la quitina también implica un gasto significativo de reactivos que conduce a un proceso menos eficiente. Con el fin de resolver este problema se sometió a la quitina a un tratamiento previo con NaOH a concentración moderada (30% p/v) durante 1 h a 100 °C. Este pre-tratamiento permitió a la enzima actuar con mayor facilidad y mejorar el grado de desacetilación. A pesar de ello, la desacetilación por esta vía continúa siendo compleja, laboriosa e inferior si se compara con el método que implica un gasto del 10% (p/v) de NaOH (Tabla 2).

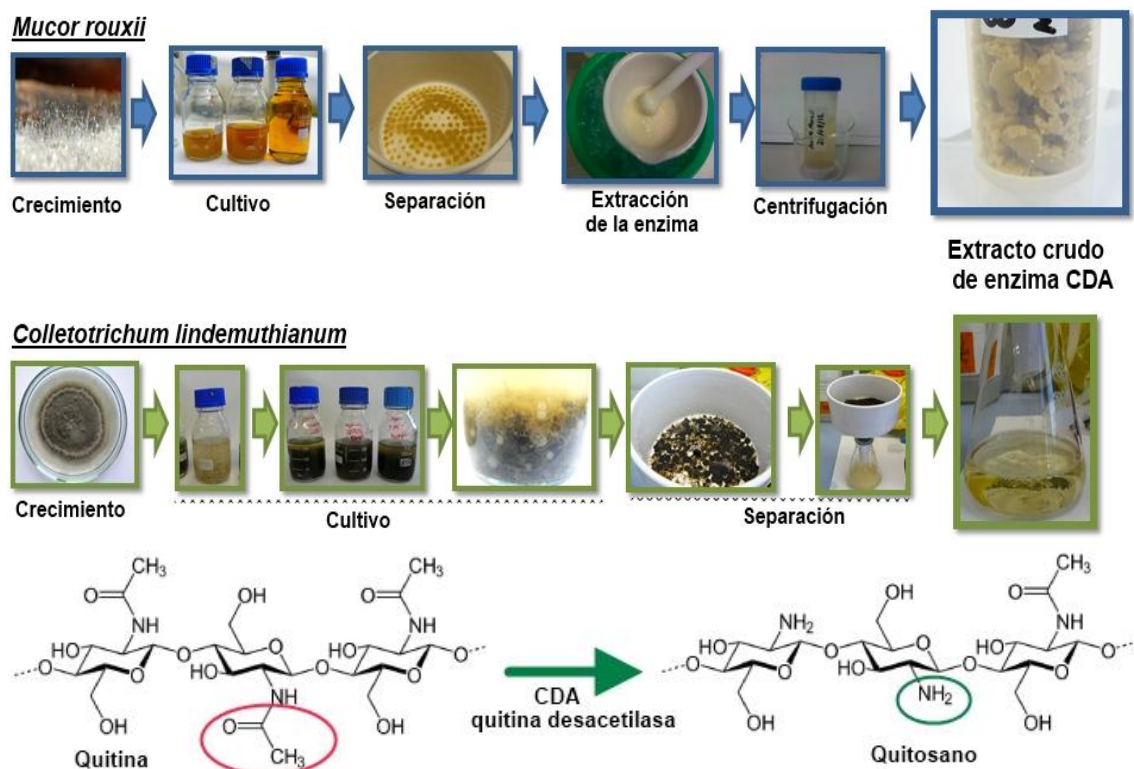


Figura 10. Obtención y mecanismo de acción de la quitina-desacetilasa (CDA) sobre el sustrato quitina.

Tabla 2. Grado de desacetilación obtenido en los distintos quitosanos a través de diferentes procesos de extracción.

	Pre-tratamiento	Desacetilación	Grado desacetilación (%)
Químico	-	40% (p/v) NaOH	84
	-	10% (p/v) NaOH	74
Enzimático Quitina-desacetilasa	HCl	<i>M. rouxii</i>	4
		<i>C. lindemuthianum</i>	8
	Metanol	<i>M. rouxii</i>	9
		<i>C. lindemuthianum</i>	5
Químico/Enzimático Quitina-desacetilasa	30% (p/v) NaOH	<i>M. rouxii</i>	75
		<i>C. lindemuthianum</i>	88

A la vista de los resultados obtenidos se estima que para la obtención de quitosano no es necesario el paso por quitina. Además, con dos horas de proceso se consigue un quitosano con un alto grado de desacetilación. Sin embargo, desde el punto de vista de aprovechamiento integral de residuos y recuperación de material de alto valor biológico como proteínas, carotenoides y lípidos es más sencillo aislar estos materiales durante la obtención de quitina

que durante la desacetilación química. Asimismo, los líquidos resultantes de la desacetilación termoquímica con soluciones acuosas de NaOH altamente concentradas (50% p/v) provocan la pérdida total de la funcionalidad de la proteína y los colorantes-antioxidantes. Por otro lado, al disminuir el consumo de NaOH en un 80% (utilización del 10% NaOH p/v) comparado con el método químico original, el quitosano fue altamente soluble, similar al obtenido cuando se utilizó un 40% p/v de NaOH.

A modo de resumen, mediante el sistema propuesto se logró optimizar un método para la obtención de quitosano: a) reduciendo etapas en el proceso, con la inherente disminución del coste de reactivos y b) con la recuperación integral de material activo a partir de los residuos de langostino. La desproteínización enzimática es un método adecuado para el aislamiento de la quitina y también para la producción de concentrados e hidrolizados de proteína con excelentes propiedades antioxidantes y aminoácidos esenciales. La eficiencia del proceso es prometedora a la hora de recuperar materiales funcionales para la aplicación en el desarrollo de recubrimientos (Fig. 11).

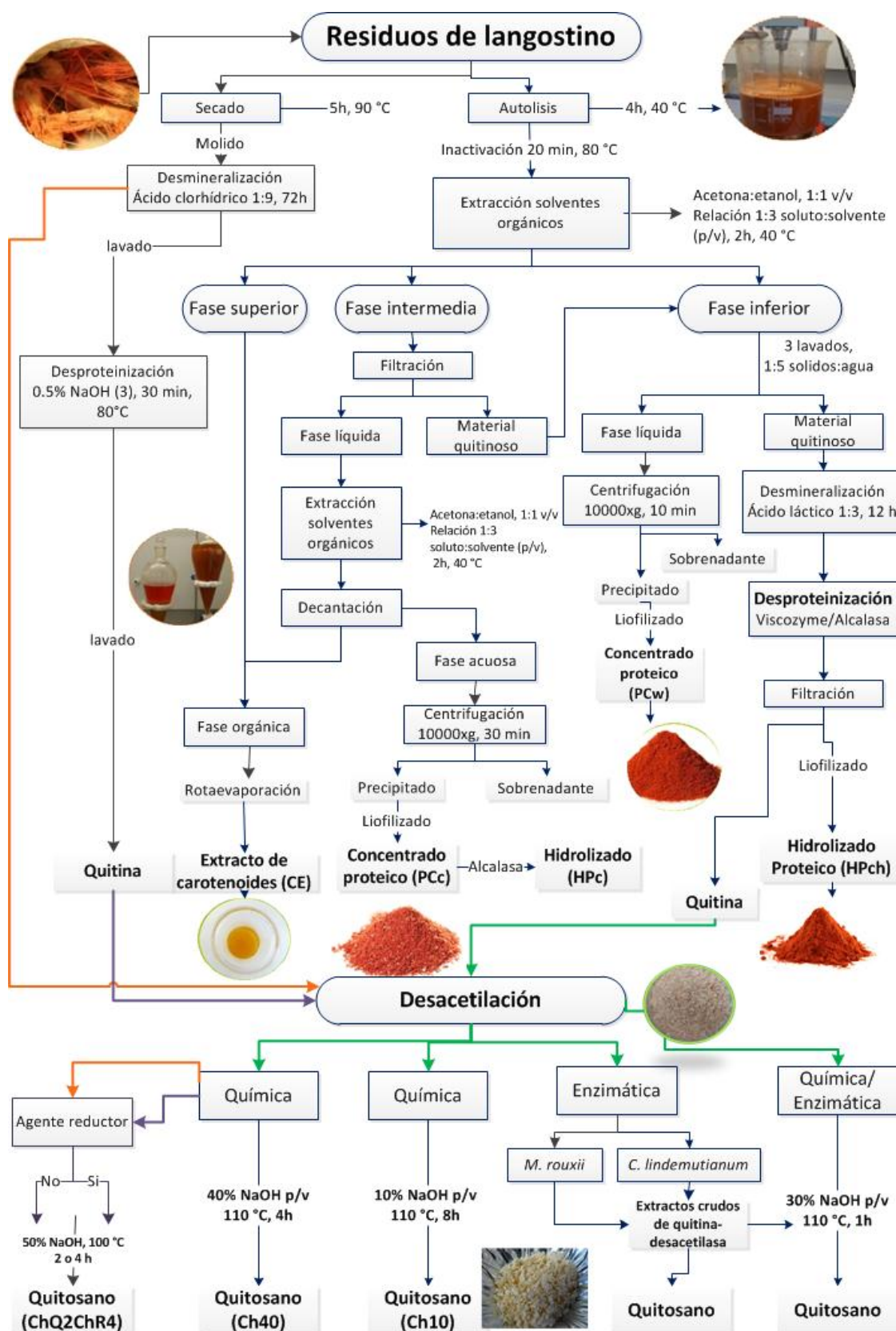


Figura 11. Esquema de la obtención de material activo y biopolímeros a partir de cabezas y exoesqueletos de *L. vannamei*

DISEÑO Y DESARROLLO DE RECUBRIMIENTOS CON EL MATERIAL OBTENIDO DE LOS RESIDUOS DE CRUSTÁCEOS Y CARACTERIZACIÓN DE SUS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y ACTIVAS

El uso de materiales poliméricos naturales para el desarrollo de envases y recubrimientos es cada vez más frecuente debido a características como biocompatibilidad, biodegradabilidad, ausencia de toxicidad, etc., entre otras. Generalmente estos materiales proceden de biopolímeros tales como polisacáridos, proteínas, lípidos y resinas. Una de las principales ventajas de la utilización de recubrimientos es que actúan como soportes de ingredientes activos (mediante su incorporación a la matriz del polímero), por lo que puede mejorar la calidad o incluso los atributos nutricionales y sensoriales del mismo (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005; Park, 1999).

Estos recubrimientos pueden sustituir en ocasiones a los plásticos convencionales, para lo cual deben ser competitivos y conferir una marcada protección al alimento en relación a los envases tradicionales. Asimismo pueden servir como vehículo para el transporte de compuestos bioactivos que puedan manifestar su actividad tras la ingesta o a nivel organoléptico en cocina de autor.

El quitosano es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa y su estructura química le confiere únicas y excelentes propiedades (antimicrobianas, antioxidantes, reguladoras de la motilidad del tránsito intestinal, como agente hipocolesterolémico, etc.) Por esta razón, algunos quitosanos obtenidos a través de diferentes metodologías resultan candidatos ideales para el desarrollo de recubrimientos con diversas propiedades.

El quitosano da lugar a películas transparentes, con alta solubilidad en agua, capacidad de humectación en superficie y estables térmicamente (Epure, Griffon, Pollet, y Avérous, 2011; Rotta *et al.*, 2009). Sin embargo, si las películas solo contienen quitosano en la formulación pueden ser frágiles y quebradizas, de ahí la necesidad de incorporar plastificantes tales como la glicerina, sorbitol o polietilenglicol (Liu, Zhou, Zhang, Yu, y Cao, 2013; Suyatma, Tighzert, Copinet, y Coma, 2005). El quitosano es insoluble en la mayoría de los disolventes, pero soluble en ácidos orgánicos diluidos como el ácido acético, fórmico o láctico (Rabea, Badawy, Stevens, Smagghe, y Steurbaut, 2003). Una vez solubilizado en medio ácido se pone de manifiesto su capacidad precursora de coberturas y películas (Ritthidej, Phaechamud, y Koizumi, 2002). En la presente Memoria, el ácido láctico fue elegido entre los solventes orgánicos por la facilidad con la que solubiliza el quitosano para formar películas y también por

su higroscopicidad, ya que es un plastificante *per se* (Tharanathan, 2003), no siendo necesario el empleo de plastificantes en la formulación.

■ **Aptitud de los quitosanos obtenidos con diversos tratamientos químicos para su aplicación como recubrimientos.**

De forma preliminar al desarrollo y caracterización de los recubrimientos de quitosano obtenidos mediante distintos métodos (Capítulos 1, 2 y 3), se determinó la solubilidad de los quitosanos en ácido láctico (0,15M, pH 5,2). El alto grado de desacetilación favoreció la solubilidad de los quitosanos (Tabla 3) debido a la presencia de grupos amino libres en las unidades de D-glucosamina (Agnihotri, Mallikarjuna, y Aminabhavi, 2004). Seguidamente, se prepararon soluciones filmogénicas para evaluar sus propiedades viscoelásticas y antimicrobianas, de gran importancia para determinar su potencial como recubrimientos.

Tabla 3. Solubilidad de los quitosanos obtenidos con y sin la etapa previa de quitina.

	Método Desacetilación	Peso Molecular (kDa)	Grado de Desacetilación (GD, %)	Solubilidad
ChQ2	Con la etapa de quitina	3000	79	✓
ChQ4		1600	83	✓
ChQR2		5600	84	✓
ChQR4		1700	86	✓
Ch2	Sin la etapa de quitina	2100	78	✓
Ch4		690	85	✓
ChR2		2200	82	✓
ChR4		830	86	✓

● **Evaluación de las propiedades viscoelásticas en las soluciones de quitosano.**

Las soluciones de quitosano al 1% p/p presentaron un comportamiento típico de solución diluida en la que predomina el comportamiento viscoso ($G'' > G'$) (Fig. 12). El quitosano ChR2 mostró una gran capacidad para establecer enlaces más energéticos, fundamentalmente interacciones hidrofóbicas ($G'' < G'$).

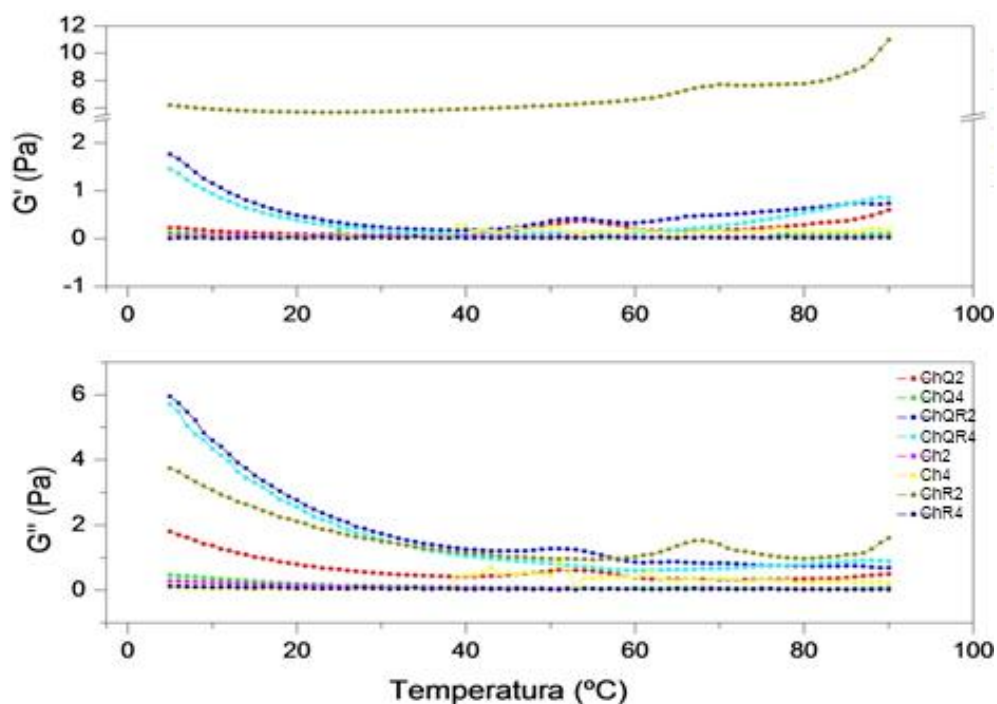


Figura 12. Dependencia del módulo elástico (G' , Pa) y el módulo viscoso (G'' , Pa) con la temperatura en soluciones de quitosano ($\text{pH } 5,7 \pm 0,2$) tras el calentamiento de 5 a 90 °C.

Para comprender mejor el efecto del método de obtención sobre las propiedades viscoelásticas, se prepararon soluciones de quitosano al 3% p/p. La Figura 13 presenta los perfiles de temperatura de las soluciones de quitosano a pH 5. Como en el caso anterior, todos los quitosanos mostraron el comportamiento viscoelástico común de un fluido newtoniano, en donde G' es menor que G'' (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput, y Kandani, 2001; Tang, Du, Hu, Shi, y Kennedy, 2007). En los quitosanos de bajo peso molecular (ChQR4, Ch4 y ChR4) también se observó un comportamiento viscoso a lo largo de todo el intervalo de temperatura. Estos quitosanos presentaron los valores menores de G' y G'' a temperaturas bajas (<10 °C). Por el contrario, ChQ2, ChQR2, Ch2, ChR2 y ChQ4 (con un peso molecular inferior), sufrieron un aumento drástico en los valores de G' a partir de distintas temperaturas (40-70 °C), dependiendo del tipo de quitosano y que es característico de un comportamiento tipo elástico, donde $G' > G''$ (Fig. 13). Este comportamiento podría estar asociado a la formación parcial de interacciones hidrofóbicas más estables inducidas por el calor.

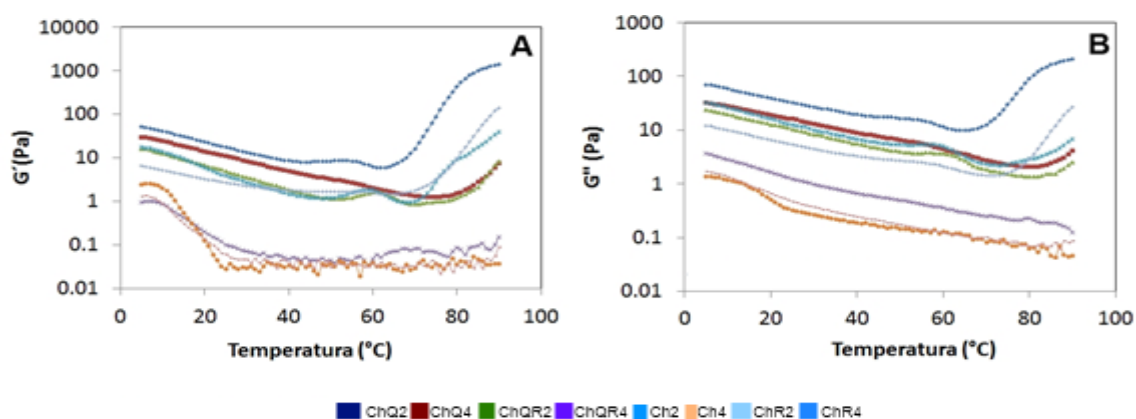


Figura 13. Dependencia del módulo elástico (G' , Pa) y el módulo viscoso (G'' , Pa) con la temperatura en soluciones de quitosano ($\text{pH } 5,7 \pm 0,2$) tras el calentamiento de 5 a 90 °C (Capítulo 1).

Es importante señalar que el quitosano ChR2 mostró una capacidad relativamente alta de agregación térmica. Este quitosano se caracterizó por poseer un peso molecular medio (2200 kDa) y menor grado de desacetilación (74,1 %). Por el contrario, el quitosano ChQ4 (con un grado de desacetilación alto, 94%, y un peso molecular relativamente menor de 1600 kDa) presentó una mayor dependencia con la temperatura y elevada resistencia de gel. Por lo tanto, el método de obtención es un factor importante que influye sobre el grado de desacetilación y el peso molecular; estos parámetros a su vez determinan las interacciones hidrófobas y los fenómenos de asociación del quitosano. En general, los quitosanos estudiados poseen propiedades viscoelásticas que pueden ser aprovechadas para el desarrollo de matrices poliméricas estables o coberturas con buena capacidad de adherencia e imperceptibles.

- **Evaluación de las propiedades antimicrobianas en las soluciones de quitosano.**

El siguiente paso fue el estudio de la actividad antimicrobiana de los quitosanos obtenidos por métodos químicos con/sin agente reductor, tanto en solución filmogénica como en cobertura y película (quitosanos ChQ2-ChR4), y tener así datos básicos de las características de los futuros recubrimientos activos. Para llevar a cabo el estudio se ajustó el pH de las soluciones ($\text{pH } 5,2$) con el fin de evitar el efecto limitante del ácido en el crecimiento de los microorganismos, ya que a este pH se mantienen disponibles los sitios activos del quitosano y pueden ejercer su actividad (No *et al.*, 2002). La capacidad antimicrobiana se evaluó frente a bacterias, mohos y

levaduras, seleccionados por ser microorganismos patógenos, organismos implicados en el deterioro de alimentos o por ser potencialmente probióticos.

En solución filmogénica, los quitosanos inhibieron tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, y los microorganismos más sensibles fueron *B. coagulans*, *P. phosphoreum*, *E. faecium* y en especial *D. hansenii*. Sin embargo, las soluciones filmogénicas no presentaron actividad frente a los mohos *A. niger* y *P. expansum*. A este respecto, Roller *et al.*, (2002) describe que las levadura son más sensibles que las bacterias a la acción del quitosano, que no resulta efectivo frente a mohos que poseen este polímero formando parte de su pared celular. (Allan y Hadwinger, 1979).

Si bien todas las soluciones filmogénicas presentaron actividad antimicrobiana, dicha actividad fue superior en los quitosanos obtenidos sin el paso previo por quitina, sin agente reductor pero con 4h de desacetilación (quitosano ChQ4) y en aquellos obtenidos sin el paso previo por quitina como etapa intermedia y con la adición de un agente reductor, independientemente del tiempo de desacetilación (ChR2 y ChR4). Estos dos quitosanos, con diferente peso molecular e igual grado de desacetilación (ChR2 y ChR4) mostraron una actividad semejante. Si bien el GD de los quitosanos aumenta con el tiempo (Tabla 1), no parece influir en la actividad antimicrobiana. La capacidad de las soluciones filmogénicas ChR2 y ChR4 fue superior a la de otros quitosanos obtenidos también por el método sin paso por quitina, como por ejemplo el T5 y T6. Quizás la presencia de un agente reductor durante el proceso de obtención (como ocurre en ChR2 y ChR4) pueda influir de alguna forma en las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas. En este sentido, algunos autores sostienen que un bajo grado de polimerización (43 kDa) y alto grado de desacetilación (94%) resultan una combinación muy favorable para que el quitosano ejerza su actividad (Devlieghere, Vermeulen, y Debevere, 2004). Además, el grado de desacetilación alto en el quitosano aumenta la solubilidad y la densidad de carga, lo que facilita su adhesión a la célula bacteriana (Aider, 2010). Por otro lado, el ChQ4 (obtenido a partir de quitina sin agente reductor) muestra una actividad antimicrobiana importante con un M_n intermedio y alto GD y que además presentó un comportamiento reológico que lo hace un buen candidato para su aplicación como cobertura.

La actividad antimicrobiana del quitosano guarda relación con el estado físico, grado de desacetilación, peso molecular, el tipo de microorganismo y otros factores ambientales intrínsecos del polímero (Kong, Chen, Xing, y Park, 2010). En este sentido, la capacidad antimicrobiana del quitosano se reduce cuando se encuentra como matriz sólida (Zivanovic, Chi, y Draughon, 2005). Así, los quitosanos presentaron mayor actividad en solución

filmogénica que en película, cuyo efecto se limitó exclusivamente a la superficie en contacto directo con la placa de agar (Fig 14), ya que en este caso la actividad del quitosano ocurre sin la migración de compuestos (Brody, Strupinsky, y Kline, 2001; Leceta *et al.*, 2013).

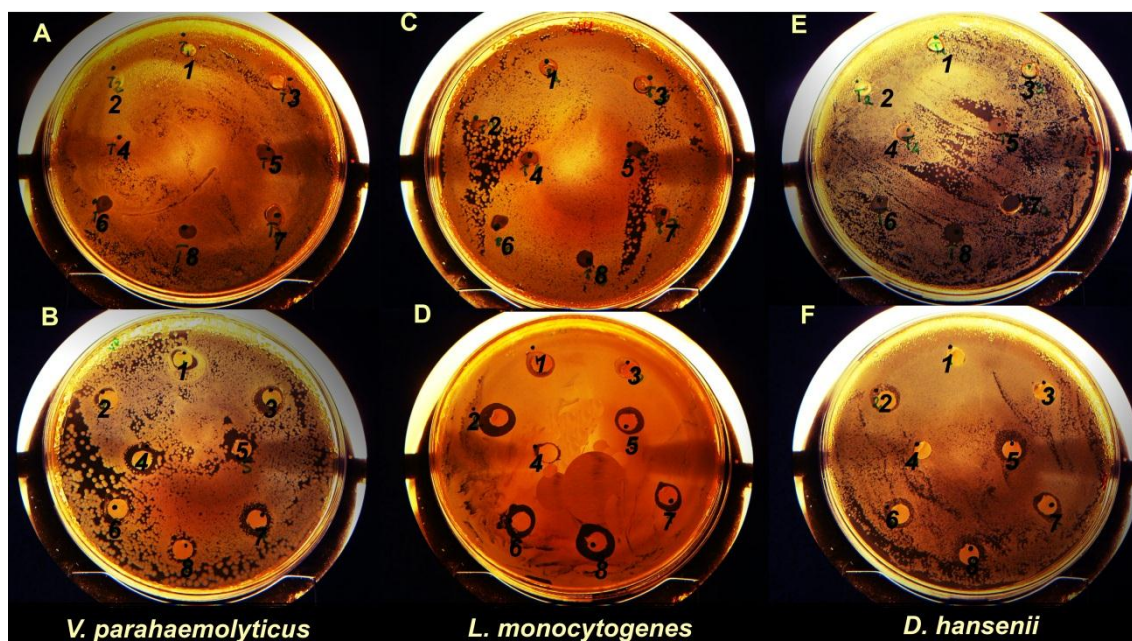


Figura 14. Actividad antimicrobiana cualitativa del quitosano en película (A, C, E) y como solución filmogénica (B, D, F). Números 1 a 8 representan a quitosanos de ChQ2 a ChR4, respectivamente.

La actividad de agua del alimento influye significativamente en el crecimiento y proliferación de microorganismos (Troller, 1980). Sin embargo, el efecto del contenido de agua en un recubrimiento apenas ha sido objeto de estudio. La hidratación en recubrimientos en base a quitosano facilita la disponibilidad de los grupos amino cargados positivamente (Pranoto, Rakshit, y Salokhe, 2005). Por ello, se consideró de gran interés examinar el potencial antimicrobiano de recubrimientos con distinto tiempo de secado (12 y 24 h) y acondicionados a diferentes humedades relativas (HR: 58%, 75% y 90%). Los quitosanos seleccionados para este estudio fueron los que presentaron mayor actividad antimicrobiana en solución filmogénica y mejores propiedades reológicas (ChQ4, ChR2 y ChR4). El comportamiento de los tres quitosanos fue semejante. En general, la actividad antimicrobiana fue mayor en las películas con 12 h de secado y en particular las mantenidas a 90% HR durante el acondicionamiento, independientemente del quitosano utilizado. El aspecto de estas películas (12 h. de secado y acondicionadas 90% H.R.) se asemejó al de una cobertura muy viscosa. El incremento en el contenido de agua aumenta los sitios activos y mejora la actividad

antimicrobiana del quitosano (Guibal, Touraud, y Roussy, 2005). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano (secadas durante 24 h) se limitó al área de la placa circunscrita a la película (zonas de la película en contacto con el agar) como se mencionó anteriormente (Fig. 15).

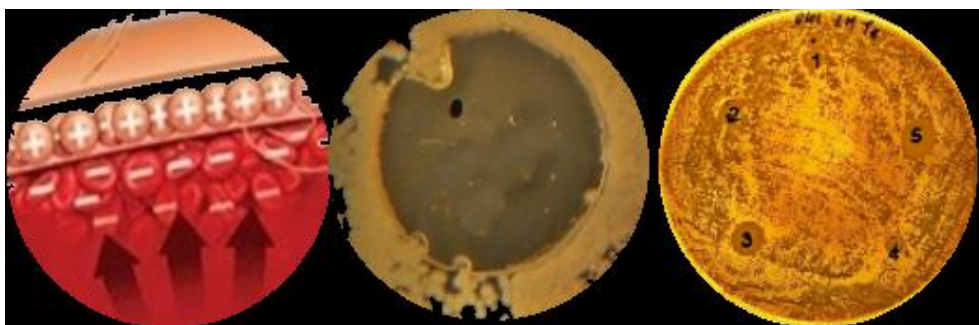


Figura 15. Actividad antimicrobiana del quitosano (ChR4) en películas secadas durante 24h acondicionadas a diferente humedad relativa: 1- 58% HR, 2- 75% HR, 4- 90% HR y películas secadas durante 12h 3- 75% HR, 5- 90% HR.

Las formulaciones ensayadas fueron efectivas frente a microorganismos relacionados con el deterioro del pescado (por ejemplo, *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*) y patógenos (ej. *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus*). Estas películas (secadas durante 12 o 24 h) aplicadas a productos de la pesca durante la conservación en refrigeración podrían contribuir a conferir estabilidad y aumentar la vida útil, tal y como se ha descrito en coberturas de quitosano aplicadas a hamburguesas y salchichas de bacalao, respectivamente (López-Caballero *et al.*, 2005a, b)

También se determinó la actividad antimicrobiana en las películas de quitosano desarrolladas a pH ácido (3,2) ya que como se describen en la sección correspondiente (Capítulo 1), los recubrimientos de quitosano se elaboran a pH 5. Los resultados revelaron que la actividad antimicrobiana de las películas frente a microorganismos más resistentes a condiciones ácidas aumenta a pH bajo (Fig. 16), independientemente del quitosano utilizado. A valores de pH ácidos, la proporción de grupos amino es mayor, si bien la carga positiva del grupo amino en el C2 se mantiene por debajo de su pKa (pH 6,3) (No, Young Park, Ho Lee, y Meyers, 2002). Además se verificó que el ácido láctico a pH 3,2 (control), no presentó actividad antimicrobiana.

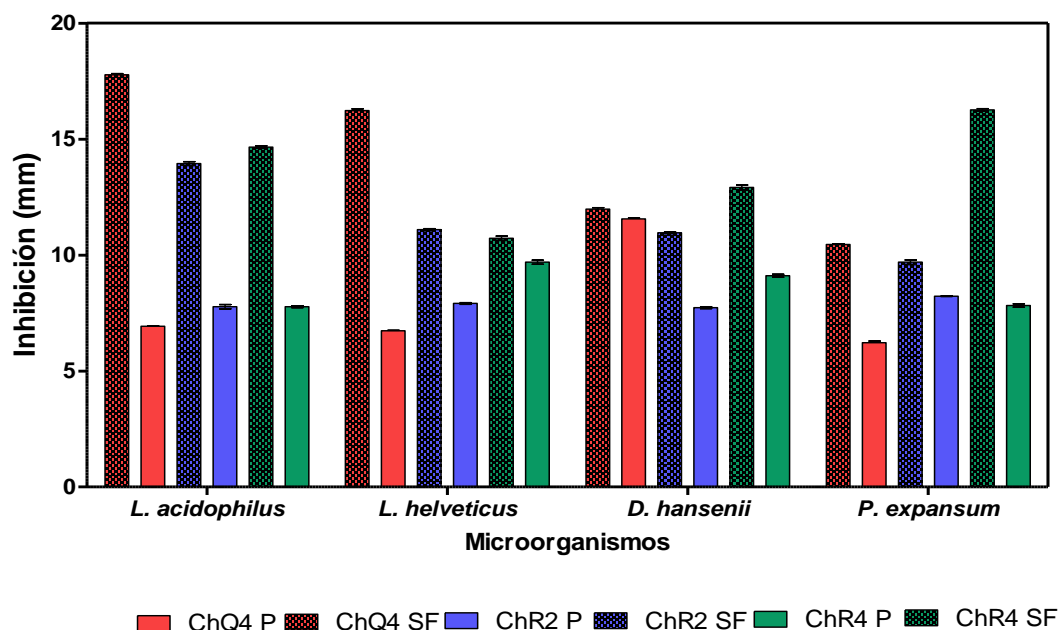


Figura 16. Actividad antimicrobiana cuantitativa (mm) de quitosanos (ChQ4, ChR2 y ChR4) a pH 3,2 en solución filmogénica (SF) y en película (P).









Se puede concluir que los quitosanos obtenidos por el método directo fueron comparables a los obtenidos de forma convencional. Es más, los quitosanos obtenidos con el método directo presentaron buenas propiedades gelificantes y filmogénicas, siendo activos y apropiados para actuar como recubrimientos. La actividad antimicrobiana fue mayor en los quitosanos con el alto grado de desacetilación y menor peso molecular, lo que permite obtener recubrimientos (soluciones filmogénicas o películas) antimicrobianos, si bien dicha actividad es mayor cuando el quitosano está en solución.

■ **Aptitud del material funcional y biopolímeros obtenidos aplicando métodos enzimáticos y químicos suaves como base para el desarrollo de recubrimientos**

Los compuestos de alto valor biológico procedentes de la autólisis de residuos de langostino constituyeron el material de partida para la elaboración de recubrimientos con propiedades activas. Las soluciones filmogénicas, coberturas y películas se formularon a partir de los quitosanos obtenidos con la inclusión de concentrados, hidrolizados proteicos y extracto de carotenoides.

La solubilidad del quitosano es un factor determinante en el desarrollo de recubrimientos. Por ello, los quitosanos obtenidos mediante los diversos métodos de desacetilación se disolvieron en ácido láctico 0,15 M. A la vista de los resultados se establece que los quitosanos obtenidos con NaOH (Ch40 y Ch10) fueron los más solubles (Tabla 4). Por otro lado, el empleo de la quitina-desacetilasa dio lugar a un material con bajo grado de desacetilación, con limitada o nula solubilidad. Al parecer estos materiales mantienen la estructura acetilada típica de la quitina (Kumar, 2000), de ahí su insolubilidad (Tabla 4). Si bien un pretratamiento con NaOH (30% p/v) permite una mejor acción por parte del extracto crudo de enzima, el método es laborioso, demasiado complejo y con menor rendimiento en comparación con los resultados obtenidos directamente con NaOH al 40% o al 10% p/v.

Tabla 4. Solubilidad de los diferentes quitosanos obtenidos.

	Pre Tratamiento	Método de desacetilación	Grado de desacetilación (GD, %)	Solubilidad
Químico	-	40% NaOH (p/v), 4h	84	
	-	10% NaOH (p/v), 72h	74	
Enzimático Quitina-desacetilasa	HCl	<i>M. rouxii</i>	4	
		<i>C. lindemuthianum</i>	8	
	Metanol	<i>M. rouxii</i>	9	
		<i>C. lindemuthianum</i>	5	
Químico/Enzimático Quitina-desacetilasa	30% NaOH (p/v)	<i>M. rouxii</i>	75	
		<i>C. lindemuthianum</i>	88	

En base a los resultados obtenidos, se decidió descartar los quitosanos obtenidos con el empleo de quitina-desacetilasa y utilizar los quitosanos Ch40 y Ch10 para el desarrollo de recubrimientos activos. De cada uno de ellos, se prepararon diversas formulaciones, tanto a pH 5 como a pH 3, con la incorporación del material activo recuperado: PCc (concentrado rico en proteínas y lípidos), HPc (hidrolizado rico en proteína obtenido por hidrólisis de PCc), HPch (hidrolizado proteico obtenido de la hidrólisis de la quitina) y CE (extracto rico en lípidos y carotenoides), con objeto de evaluar si este material aportaba otras propiedades que permitiera diversificar y abrir el abanico de posibilidades que ofrece el quitosano por sí solo.

Las soluciones filmogénicas de los quitosanos (Ch40 y Ch10) con los materiales activos descritos fueron muy homogéneas, sin una visible separación de fases, y una vez moldeadas formaron películas integrales y maleables.

De cara a una potencial aplicación en alimentos, las soluciones formadas deben ser estables y de aspecto uniforme, por lo que la viscosidad es un valioso aporte. Las soluciones filmogénicas de quitosano obtenidos con 40% p/v (Ch40) y 10% p/v (Ch10) de NaOH registraron una viscosidad de 145 mPa.s y 5820 mPa.s, respectivamente. Según Zhou *et al.*, (2008) esta gran diferencia puede estar directamente relacionada con el grado de desacetilación y aumenta cuando éste es cercano a 75%, como es el caso de Ch10, favorecido además por su peso molecular (320 kDa) que es superior al Ch40 (108 kDa). Sin embargo, tras la incorporación de cualquier material activo se produjo una significativa reducción de la viscosidad. La adición de PCc y de CE reduce a la mitad la viscosidad en ambos quitosanos (Fig. 17), al incorporar los hidrolizados proteicos HPc y HPch, la reducción fue aún mayor (~ 3 veces). La actividad del quitosano no solo depende del GD sino de cómo están distribuidos los grupos amino a lo largo de la cadena polimérica, por lo tanto el peso molecular juega un papel importante. Si la proteína tiene un peso molecular mayor que el del quitosano, la cadena polimérica es más corta, por lo que su viscosidad es menor. Sin embargo, una cadena polimérica más larga tiene la posibilidad de interactuar consigo mismo, además favorecida por la incompatibilidad termodinámica que existe entre el quitosano y la proteína, lo que da lugar a formar un red más fuerte (Speiciene, Guilmineau, Kulozik, y Leskauskaitė, 2007). Por lo tanto la viscosidad de los recubrimientos puede variar en función del tipo de compuesto (composición) y el grado de interacción con las moléculas de quitosano, así como el grado de interferencia con la agregación intrínseca del quitosano. Según algunos autores, la presencia de sales minerales, por ejemplo, impiden la auto-agregación del quitosano causando una disminución notable de la viscosidad (Park yZhao, 2004).

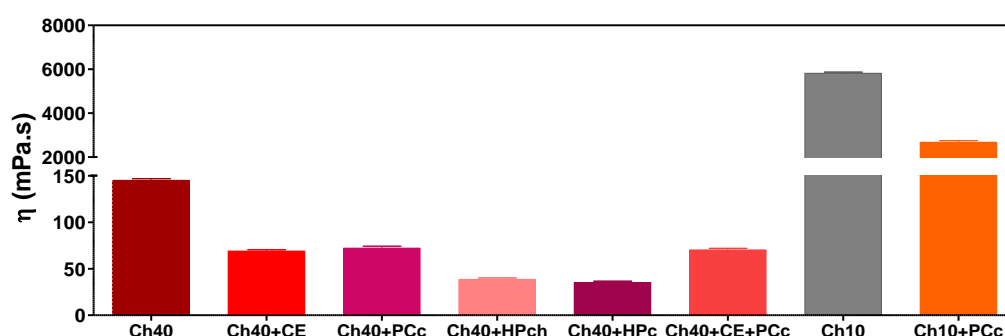


Figura 17. Viscosidad de las soluciones de quitosano y materiales activos recuperados.

El material activo incorporado en el presente estudio podría estar interfiriendo con las interacciones intra e intermoleculares del quitosano, produciendo una disminución notable del

comportamiento viscoso en las soluciones de mezcla (que presentan un gran contenido de minerales y azúcares). A pesar de ello, ninguno de los materiales ensayados obstaculizó el comportamiento viscoso de las soluciones, lo cual permite su aplicación como material de revestimiento en alimentos. Sin embargo, la aplicación potencial de estos materiales depende de que conserven sus actividades antioxidantes y antimicrobianas cuando forman parte de una formulación.

Con el fin de comprobar la actividad de los materiales recuperados una vez incorporados en las formulaciones (como soluciones filmogénicas o coberturas), se determinaron sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Las soluciones elaboradas con quitosano Ch40 mostraron actividad antioxidante medida por ABTS y FRAP (Fig. 18). Si bien la capacidad del quitosano para secuestrar radicales libres está relacionada con la presencia de los grupos amino y el peso molecular, los valores de ABTS y FRAP aumentaron considerablemente tras la incorporación de los materiales activos recuperados. Los carotenoides (CE), al incorporarse en la emulsión formada con el quitosano (Ch40-CE), se estabilizan y muestran gran capacidad antioxidante, tal como se observa por ABTS. El concentrado PCw, que apenas presentó actividad antioxidante, no se utilizó en las formulaciones. Los hidrolizados HPch y HPc también presentaron actividad antioxidante. Sin embargo, la adición de extracto lipoproteico PCc incrementó considerablemente los valores de FRAP y ABTS, siendo el más activo de los concentrados e hidrolizados de naturaleza lipoproteica obtenidos. Dada la gran actividad de CE y PCc, se desarrolló una solución filmogénica más compleja (Ch40+CE+PCc), que sin embargo presentó los valores de ABTS más bajos, si bien la capacidad reductora aumentó (Fig. 18). Este hecho se puede atribuir a las posibles interacciones del quitosano, polielectrolito altamente reactivo, con el material proteico y carotenoides, que afecta a su capacidad radicalaria cuando se encuentra como cobertura. Los resultados demuestran que la actividad de las formulaciones viene condicionada por el tipo de material activo utilizado. Liñán-Cabello *et al.*, (2002) observaron la gran capacidad antioxidante de los carotenoides extraídos a partir de crustáceos, especialmente astaxantina. Asimismo, se ha documentado la actividad antioxidante de hidrolizados obtenidos de varias especies entre ellas *Penaeus sp.*, (Manni, Ghorbel-Bellaaj, Jellouli, Younes, y Nasri, 2010).

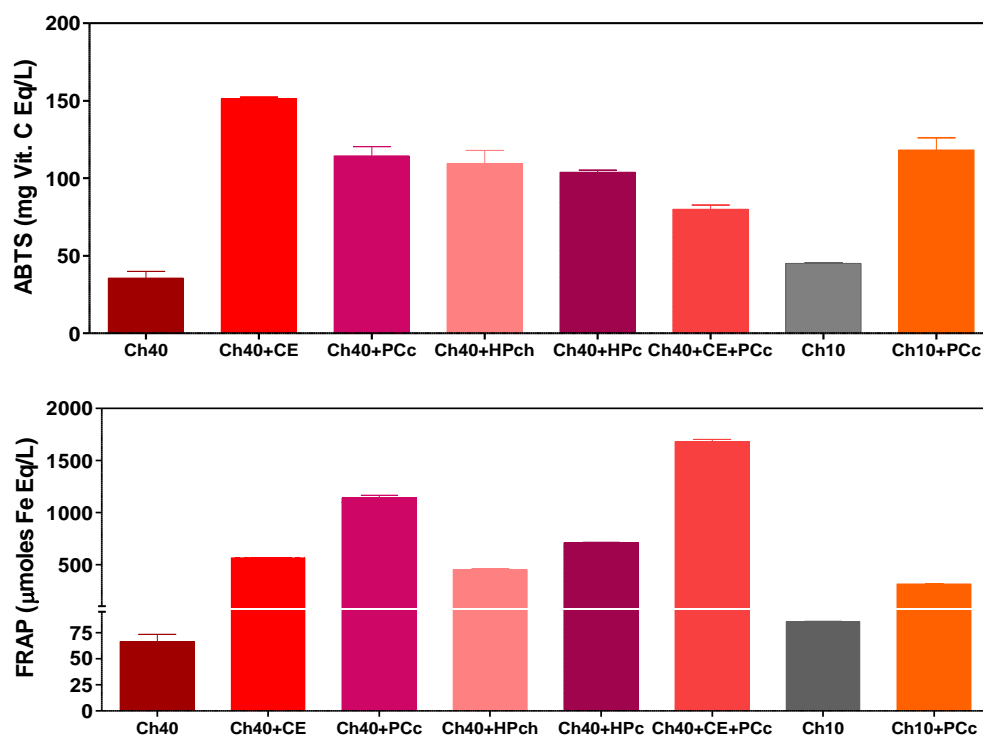


Figura 18. Propiedades antioxidantes de las soluciones filmogénicas en base a quitosano Ch40 y Ch10 con los materiales activos recuperados (CE, PCc, HPch, HPc).

En cuanto al Ch10 se solubilizó fácilmente y presentó actividad antioxidante en solución filmogénica (Fig. 18), por ABTS y FRAP, que además fue ligeramente superior a Ch40. La mezcla entre PCc y Ch10 dio base a una solución filmogénica (Ch10-PCc) que, al igual que el resto de soluciones, presentó gran actividad antioxidante y además fue más viscosa, hecho especialmente interesante a la hora de aplicarla a modo de cobertura en un alimento favoreciendo la adhesión. Por otro lado, los hidrolizados HPc y HPch presentaron actividad antioxidante, si bien una vez incorporados en la formulación ejercieron un efecto considerable sobre la viscosidad que podría limitar ciertas aplicaciones tecnológicas, en donde se requiere una mayor adherencia del quitosano

En la Figura 19 se presentan las películas y soluciones filmogénicas obtenidas al mezclar el quitosano (Ch40) con los dos tipos de hidrolizados proteicos obtenidos: uno procedente de la hidrólisis de PCc con Alcalasa (HPc) y el otro procedente de la desproteínización de la fracción quitinosa mediante Alcalasa y Viscozyme (HPch). Los hidrolizados confirieron coloraciones

anaranjadas a los recubrimientos debido a la presencia de carotenoides (complejo lípido-caroteno-proteína).



Figura 19. Aspecto de los recubrimientos: películas y soluciones filmogénicas en base a quitosano (Ch40) con un hidrolizado obtenido a partir del concentrado proteico (HPc) y del obtenido a partir de la fracción quitinosa (HPch), a pH 5 y pH 3.

El mecanismo de captación de radicales libres del quitosano se relaciona con que los radicales libres pueden reaccionar con los grupos amino residuales (NH_2 libres) para formar radicales estables, y los grupos NH_2 pueden formar grupos amino NH_3^+ mediante la absorción de un ión de hidrógeno de la solución. Además, depende del grado de desacetilación del quitosano; un alto grado de desacetilación aumenta la captación de radicales libres (Xing *et al.*, 2005).

Tal y como se describió anteriormente, el quitosano posee actividad antimicrobiana, la cual depende principalmente del tipo de quitosano (peso molecular, grado de desacetilación), pH del medio, así como del tipo de microorganismos (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos, y Montero, 2005). En general, la actividad antibacteriana de las soluciones filmogénicas fue manifiesta en el quitosano Ch40. Sin embargo, tras la incorporación del extracto lipoproteico (PCc) dicha actividad aumentó (Fig. 20). La capacidad antimicrobiana en PCc está asociada probablemente a la presencia de polipéptidos de la hemocianina (~50 kDa) (Decker y Jaenicke, 2004) o de péptidos lineales (con una alta proporción de residuos de arginina, prolina, glicina, triptófano o histidina) en el extracto lo cual puede favorecer la actividad antimicrobiana, según describe (Rosa y Barracco, 2010). La actividad antimicrobiana aumentó en Ch40-PCc con respecto a Ch40, especialmente a pH 3. Los microorganismos más sensibles fueron *C. perfringens*, *S. sonnei*, *B. coagulans* y *L. innocua*. El extracto de

carotenoides (CE) disminuyó ligeramente la actividad cuando se incorporó a las formulaciones de quitosano Ch40 (por ejemplo, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*) (Fig. 20). Este hecho se atribuye a una competencia por las cargas positivas del quitosano (Ch40) y el extracto lipoproteico (PCc) con el extracto de carotenoides (CE) y la membrana celular de los microorganismos (Fig. 21).

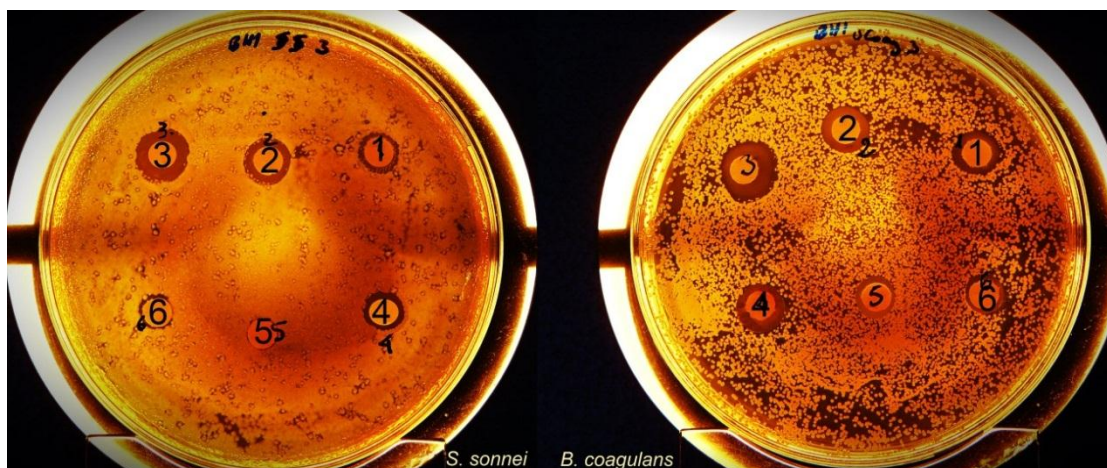


Figura 20. Actividad antimicrobiana de las soluciones a pH 3 de: 1) Ch40; 2) PCc; 3) Ch40+PCc; 4) Ch40+PCc+CE; 5) Ch40+CE; 6) CE.

A pH ácido, tanto el quitosano como las proteínas pueden cargarse positivamente (Devlieghere *et al.*, 2004) e interactuar con la carga negativa de la superficie de las bacterias, lo que altera la integridad de la membrana del microorganismo mejorando así el efecto antimicrobiano (Fig. 21).



Figura 21. Posible modo de acción del quitosano.

El resto de materiales activos aislados presentaron únicamente una excelente actividad antioxidante. La actividad antimicrobiana de fracciones de péptidos bioactivos entre 1 y 3 kDa obtenidos por hidrólisis de túnicas de calamar (*Dosidicus gigas*) ha sido descrita (Gómez-Guillén *et al.*, 2010) sin embargo los hidrolizados proteicos del presente estudio (HPc y HPch) no demostraron actividad antimicrobiana tanto a pH 3 como a pH5 (Fig. 22).

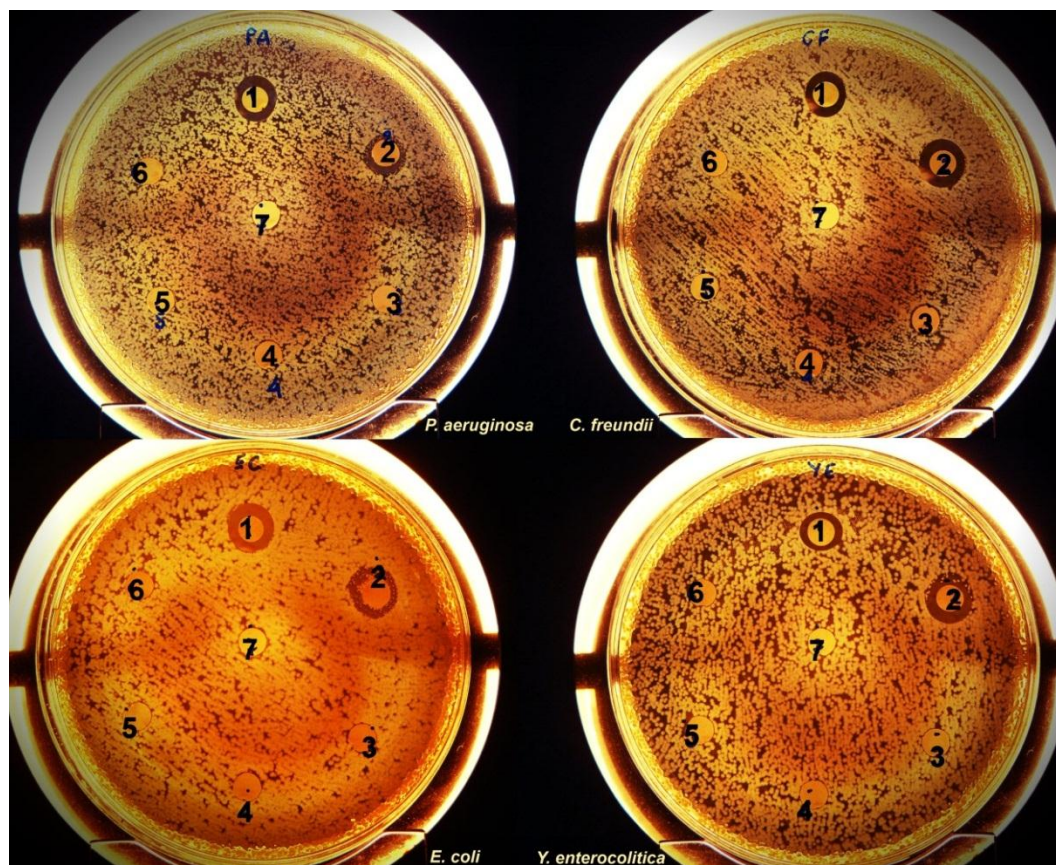


Figura 22. Actividad antimicrobiana de las soluciones: **1)** Ch40+PCc a pH3; **2)** Ch10+PPc a pH 3; **3)** HPch a pH3; **4)** HPc a pH 3; **5)** HPch a pH 5; **6)** HPc a pH 5; **7)** ácido láctico 0,15 M a pH 3.

El quitosano Ch10 también presentó actividad antimicrobiana al combinarse con PCc, especialmente frente a *P. aeruginosa*, *C. frenduii*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, entre otros (Fig. 22). La solución de ácido láctico (0,15M) utilizada como solvente de los quitosanos y del material activo no presentó actividad antimicrobiana frente a los 26 microorganismos ya referidos. Todo lo planteado anteriormente es una muestra de que el mecanismo de acción antimicrobiano del quitosano es complejo, especialmente cuando se combina con otros materiales.

En base a estos resultados, en los que ambos quitosanos obtenidos con soluciones acuosas al 40% o 10% (p/v) de NaOH (Ch40 y Ch10, respectivamente) mostraron una actividad antimicrobiana y antioxidante similar, se seleccionó el quitosano Ch10 para la formulación de películas (Fig. 23), ya que su obtención supone un ahorro considerable en el coste de producción. Este quitosano además presentó la mayor viscosidad (Fig. 17) y mantuvo las propiedades activas del quitosano, solo o en combinación con el extracto lipoproteico PCc.

Como ya se mencionó con anterioridad, entre los materiales activos recuperados, el PCc fue el más abundante durante la extracción y presentó la mayor actividad antioxidante y antimicrobiana. Las películas formuladas con estos materiales se evaluaron en base a sus propiedades físicas y activas.



Figura 23. Quitosano obtenidos durante la desacetilación con 10% (p/v) de NaOH (Ch10) y extracto lipoproteico (PCc).

Entre las muchas propiedades que posee una película, la transparencia es un parámetro importante, en especial en el envasado de alimentos quizás por la comparación implícita con un plástico convencional, que además permite visualizar el producto. Las películas formuladas solo con quitosano (Ch10) resultaron muy transparentes (transparencia ~ 83%) en relación a aquellas en las que se incorporó el extracto lipoproteico (~ 57%) (Fig. 24). Además, la adición de PCc mejora la barrera a la luz UV y visible en torno al 60%, con un incremento en los valores de luminosidad y una coloración anaranjada de la película por la presencia de carotenoides en PCc.

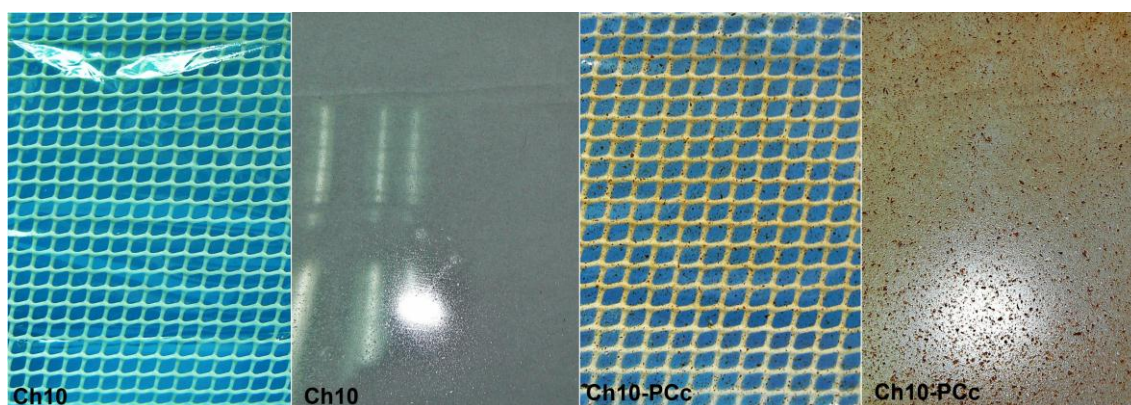


Figura 24. Películas en base a quitosano (Ch10) con extracto lipoproteico (Ch10+PCc) a pH 3.

La matriz de quitosano sufrió cambios significativos en sus propiedades físicas, químicas y activas al incorporar el extracto lipoproteico. Así por ejemplo, con microscopía *cryo*-SEM se observó que el extracto PCc se distribuye a modo de inclusiones en la matriz uniforme de quitosano, provocando además un incremento en el espesor, hasta 5 veces superior en la película Ch10+PCc (Fig. 25).

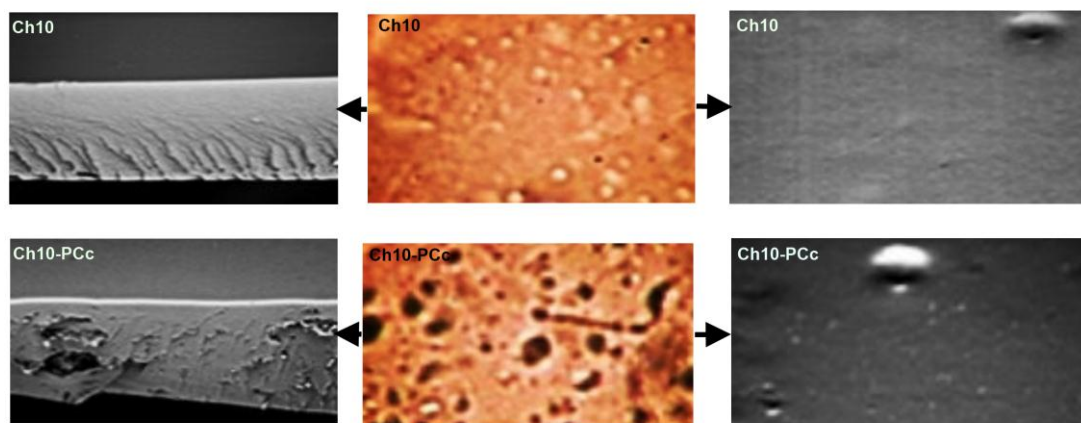


Figura 25. Apariencia bajo estereomicroscopio y microestructura por *cryo*-SEM de las películas de quitosano (Ch10) y quitosano + extracto lipoproteico (Ch10+PCc).

Las propiedades térmicas de la película de quitosano, estudiadas por calorimetría diferencial de barrido, también sufrieron modificaciones al incorporar el extracto PCc. En los termogramas, la presencia de PCc provoca cambios en la matriz polimérica de quitosano, actuando como un protector frente a la degradación (Fig. 26). Este efecto podría ser atribuido a la presencia de proteína de langostinos presentes en PCc, dado su naturaleza mayoritariamente proteica (42,27%). A esta temperatura han sido descritos la hemocianina ($\sim 79^\circ\text{C}$) y la actina (70 a 75°C) (Er, Liu, Patane, Dehghani, y Gomes, 2011; Wright, Leach, y Wilding, 1977). Estas observaciones se confirmaron por la transición térmica observada a $73,57 \pm 1,12^\circ\text{C}$ ($8,57 \pm 2,13 \text{ W/g}_{b.s.}$) en el concentrado proteico (Fig. 26, recuadro). Dado que PCc proviene del cefalotórax, cabe pensar que este evento térmico corresponde a la presencia de hemocianina.

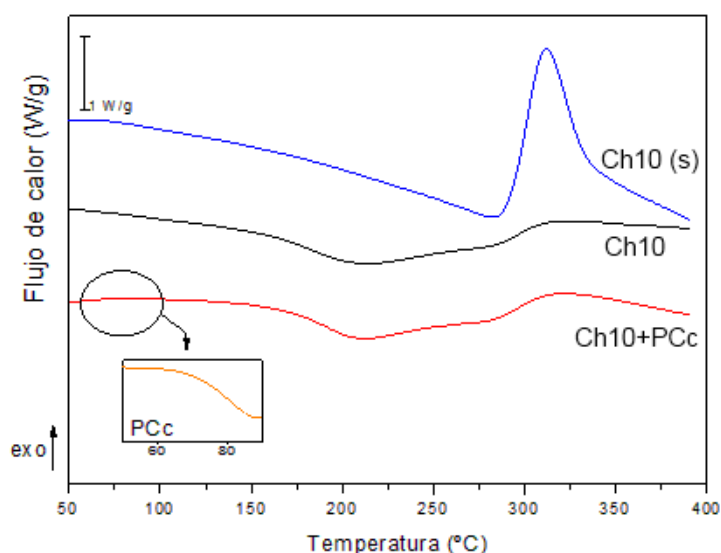


Figura 26 Termogramas del quitosano sólido ($\text{Ch10}_{(s)}$), extracto lipoproteico sólido (PCc), película de quitosano (Ch10) y película de quitosano con extracto lipoproteico (Ch10+PCc).

En cuanto a los cambios conformacionales determinados por FT-IR, el extracto lipoproteico genera una marcada interferencia en la matriz de quitosano según revela la segunda derivada de la estructura secundaria (indicados por flechas). Además, la adición de PCc aumenta la presencia de los grupos amino protonados, lo que da lugar a un incremento en la intensidad de banda a 1538 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} por la deformación e inflexión del grupo N-H (Fig. 27).

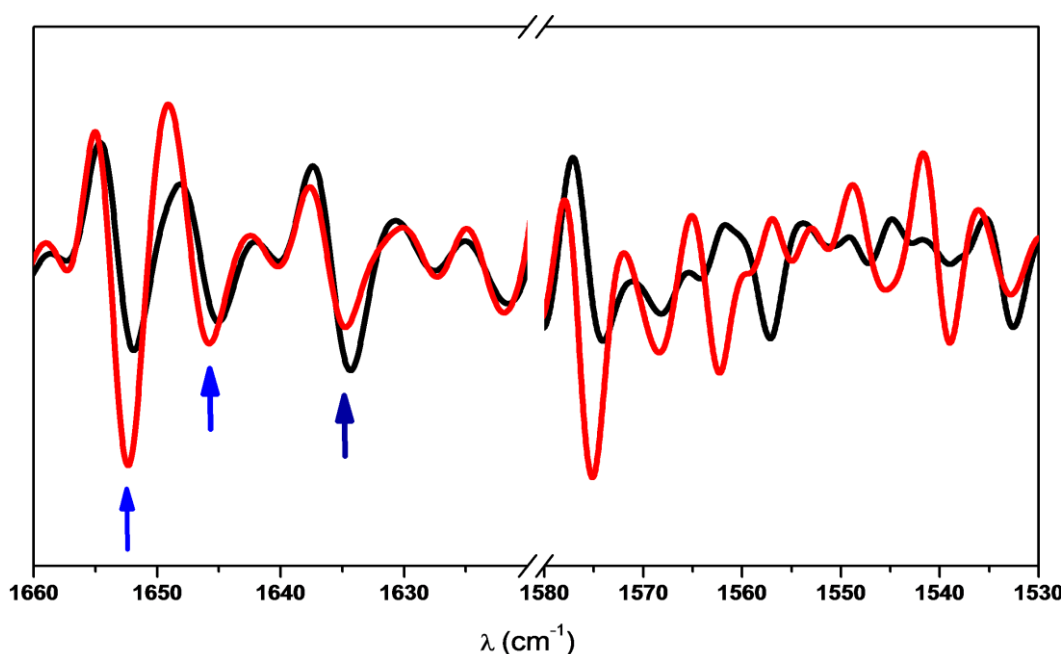


Figura 27. Segunda derivada obtenida por FT-IR de las películas de Ch (negro) y Ch+PCc (rojo)

La incorporación del extracto lipoproteico (PCc) afectó también a las propiedades mecánicas de las películas. Las películas Ch10+PCc fueron más rígidas y elásticas que las de quitosano pero poco resistentes a la deformación (Fig. 28). En este sentido, la adición de proteínas a la soluciones de quitosano afecta directamente las propiedades mecánicas y a la funcionalidad del quitosano (Ferreira, Nunes, Delgadillo, y Lopes-da-Silva, 2009).

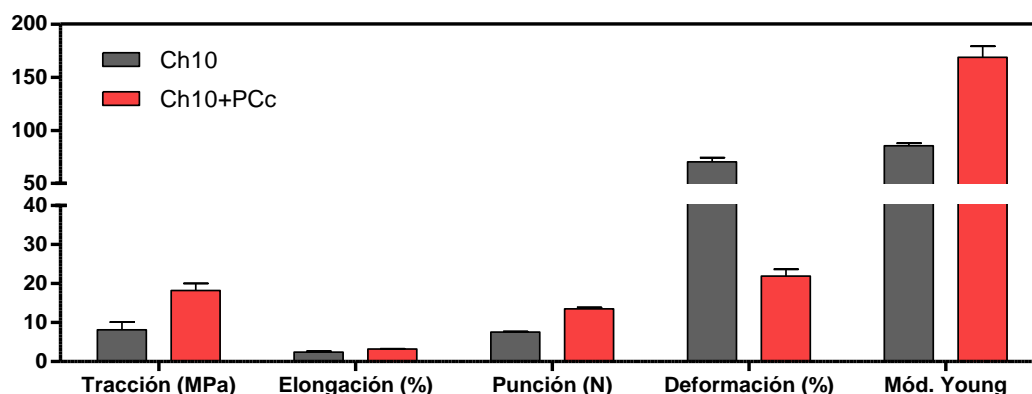


Figura 28. Propiedades mecánicas de las películas de quitosano (Ch10) y películas de quitosano y extracto lipoproteico (Ch10+PCc)

Por otro lado, la adición de PCc no favoreció la disminución de los valores de permeabilidad al vapor de agua. El extracto lipoproteico (PCc) es un material heterogéneo que contiene un 11,48% de lípidos, que pueden producir un ambiente hidrofóbico externo o impedir la entrada y absorción de agua en la matriz de quitosano (altamente higroscópica *per se*), dando como resultado valores de humedad bajos (21,19% Ch10 vs. 9,07 % Ch10+PCc). La materia soluble total (TSM) fue superior en la película de quitosano que en la película con PCc (41,22% vs. 36,02%) probablemente porque la proteína se encuentra emulsionada con los lípidos en PCc, haciéndola más insoluble. Asimismo y como se esperaba, ambas películas presentaron una baja resistencia al agua (Fig. 29) probablemente debido a las condiciones ácidas (pH 3,2) a las que se formularon. A pesar de ello, la resistencia fue ligeramente superior en la película de quitosano-PCc, ya que el extracto puede formar su propia matriz, superponiéndose a la del quitosano o reforzándola.

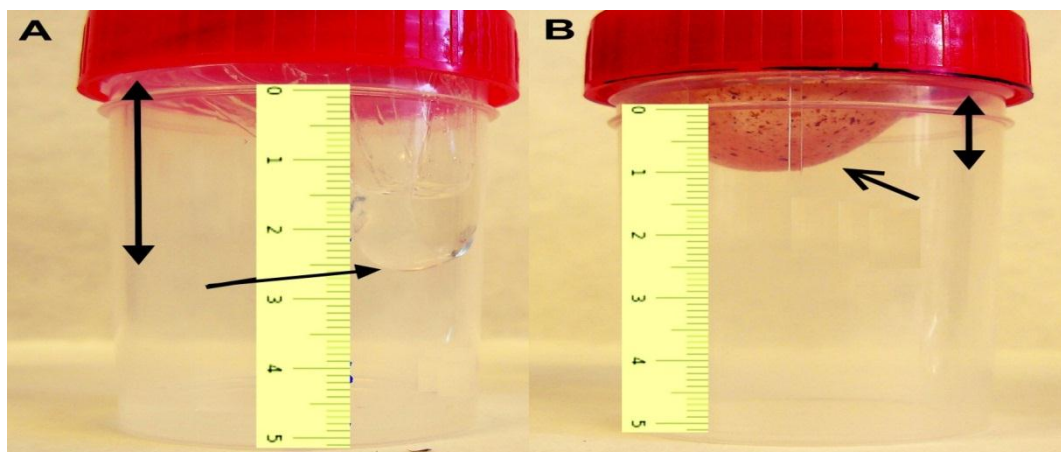


Figura 29. Prueba de resistencia al agua en películas de: A) quitosano (Ch10) y B) quitosano con extracto lipoproteico (Ch10+PCc).

Si bien los materiales utilizados Ch10 y PCc presentaron actividad antioxidante y antimicrobiana *per se* y en solución filmogénica, se evaluó si mantienen la actividad una vez que adoptan la forma de una película. Tal y como se describió anteriormente, la capacidad del quitosano para secuestrar radicales libres está relacionada con la presencia de los grupos amino y el peso molecular, mientras que la capacidad antioxidante de PCc se relaciona con la presencia de carotenoides, especialmente astaxantina (6,1 mg/100 g de polvo seco). También es posible que pudiera haber péptidos bioactivos con esta capacidad en el concentrado lipoproteico. Las películas siguieron un patrón similar al de las soluciones filmogénicas, dado la técnica utilizada para el ensayo, la propia solubilidad de las películas hace que se obtengan valores menores en comparación con los de la solución filmogénica. Sin embargo, el efecto antioxidante tras la adición de PCc continúa siendo significativo, dando como resultado un incremento considerable en los valores de ABTS y FRAP (Fig. 30).

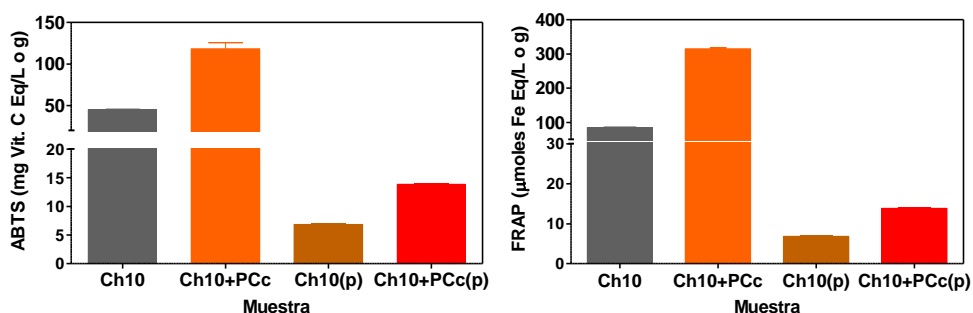


Figura 30. Propiedades antioxidantes de las soluciones filmogénicas y películas (p) en base a quitosano (Ch10) y quitosano con el extracto lipoproteico (Ch10+PCc).

La actividad antimicrobiana de las películas de quitosano se limita y circunscribe al área de contacto entre la película y el agar. Por esta razón, con el fin de verificar el alcance de su efectividad, se analizó una porción de agar (de peso conocido) en contacto directo con la película, previamente inoculada con microorganismos. Así se pudo comprobar que el quitosano (Ch10) en película posee un efecto antibacteriano y que la incorporación del extracto lipoproteico (PCc) aumenta significativamente esta propiedad, posiblemente a través de un efecto sumatorio (Fig. 31). Esta capacidad antimicrobiana es de suma importancia para inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes o patógenos (Fig 32).

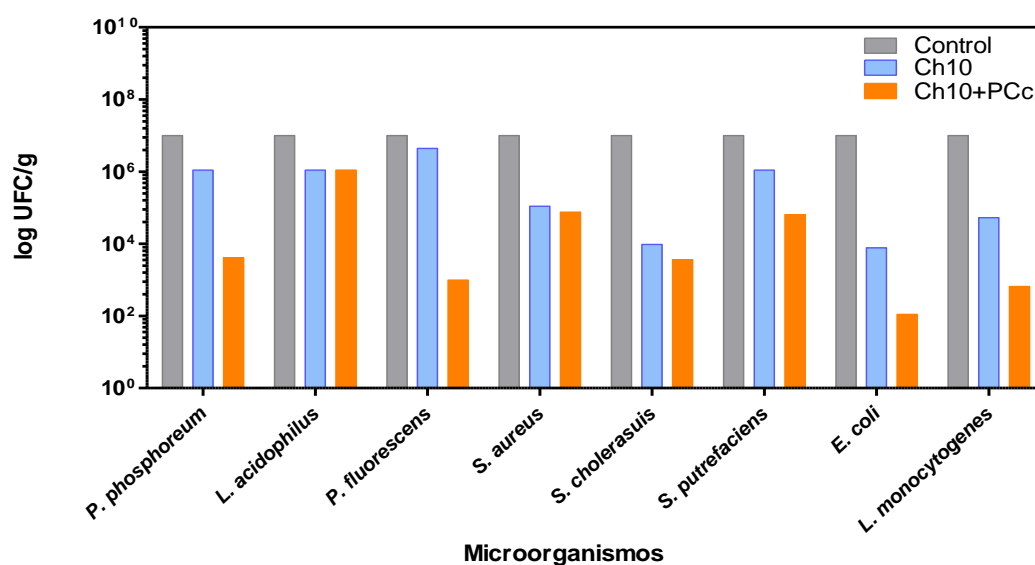


Figura 31. Actividad antimicrobiana (UFC/g) del control (sin película), película de quitosano (Ch10) y película de quitosano con extracto lipoproteico (Ch10+PCc) frente a diferentes microorganismos del deterioro.

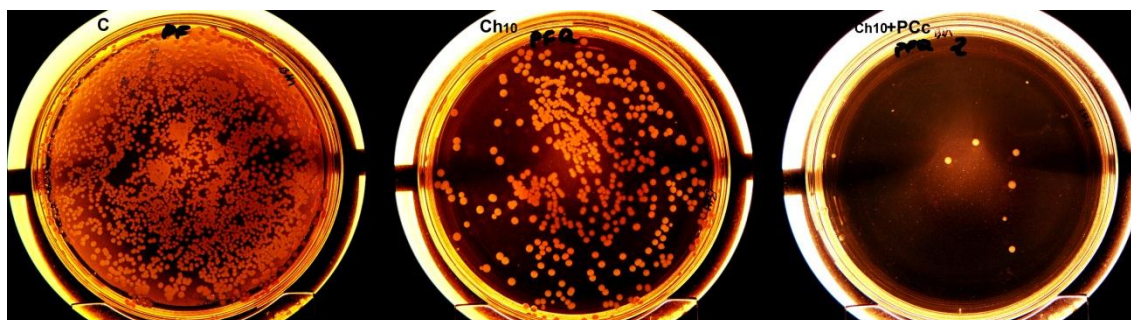


Figura 32. Actividad antimicrobiana frente a *P. fluorescens*: placa control (sin película, C), películas de quitosano (Ch10) y películas de quitosano y extracto lipoproteico (Ch10+PCc).

APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE QUITOSANO Y EXTRACTOS LIPOPROTEICOS DE CRUSTÁCEOS A PRODUCTOS DE LA PESCA Y ACUICULTURA DURANTE LA CONSERVACIÓN EN ESTADO REFRIGERADO

Las propiedades funcionales y activas de los materiales obtenidos a partir de los residuos de langostino (cabezas y exoesqueletos) hacen de estos materiales candidatos idóneos para el desarrollo de recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. Por ello se diseñó una cobertura basada en quitosano (Ch10) y extracto lipoproteico (PCc) para aplicarla en langostino (*L. vannamei*) y estudiar su papel durante la conservación en refrigeración. Es importante destacar la originalidad de esta aportación, ya que no se tiene conocimiento de coberturas desarrolladas íntegramente a partir de residuos de langostino y posterior aplicación en alimentos.

La cobertura Ch10-PCc ejerció su efecto sobre la microbiota mediante el aumento de la fase de latencia, que fue especialmente llamativo en los aerobios mesófilos viables, microorganismos productores de H_2S y colonias luminiscentes, entre 7-10 días. Este hecho es de gran importancia, ya que a estos dos últimos grupos pertenecen *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*, respectivamente, ambos organismos involucrados en el deterioro de productos pesqueros. Las coberturas también disminuyeron la tasa de crecimiento exponencial, con reducciones que fueron desde 1,5 ciclos logarítmicos (flora total y *Pseudomonas*) hasta más de 4 ciclos en organismos productores de H_2S . La actividad antimicrobiana de la cobertura Ch10+PCc se atribuye a la presencia de grupos amino protonados, según se confirmó por FT-IR en apartados anteriores (Fig. 27).

El lote con el baño de ácido láctico exclusivamente evolucionó de forma prácticamente idéntica al lote control, por lo que el efecto de las coberturas se atribuye al quitosano y/o en su caso al extracto lipoproteico, y no al efecto limitante del pH causado por el ácido en el que se disuelve el quitosano y el extracto PCc. El lote con cubierta de quitosano presentó unos valores intermedios (Fig. 33). Los recuentos de microorganismos totales y *Pseudomonas* se igualan en todos los lotes a partir de los 14 días de conservación; es decir, para estos microorganismos, la efectividad de la película queda restringida al mencionado periodo, no así en el resto de los grupos estudiados. Las bacterias lácticas no se ven favorecidas por la presencia de la cobertura tal como se ha descrito en la literatura (López-Caballero *et al.*, 2005, 2006).

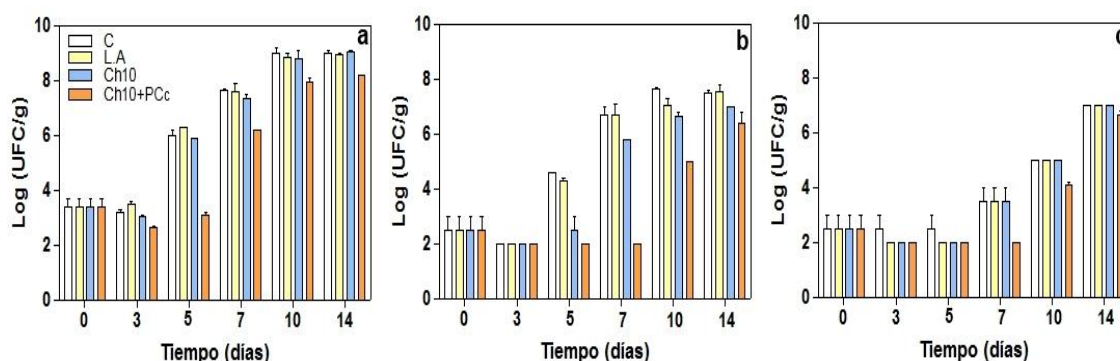


Figura 33. Recuentos de a) microorganismos aerobios mesófilos viables, b) microorganismos productores de H₂S, c) colonias luminiscentes, en langostinos sin recubrimiento (C), recubiertos con un baño de ácido láctico 0,15M (L.A), cobertura de quitosano (Ch10) y cobertura de quitosano con concentrado proteico (Ch10-PCc).

Los recuentos microbiológicos guardan relación con los valores de pH y bases volátiles, indicadores de la calidad del producto (Fig 34). La cobertura de quitosano reduce el acúmulo de compuestos básicos a diferencia de lo que ocurre en el lote control y en los bañados con ácido láctico. Es más, el efecto sumatorio de PCc y el quitosano fue evidente y aumentó la vida útil del langostino durante la conservación.

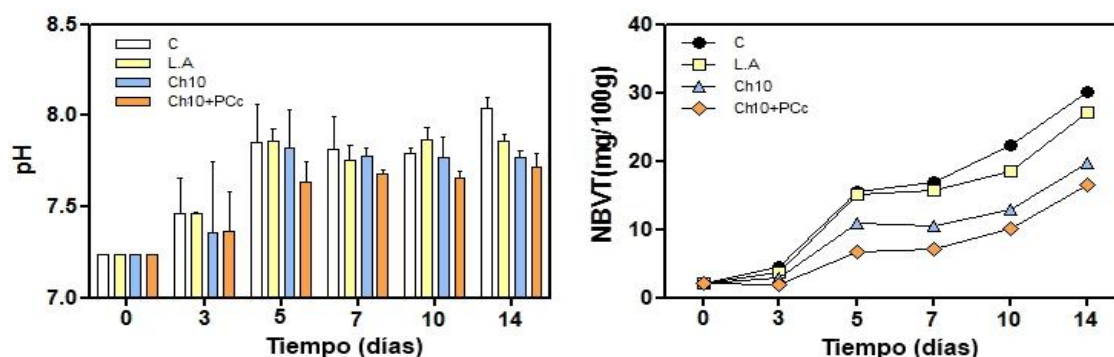


Figura 34. pH y Nitrógeno básico volátil total en langostinos sin recubrimiento (C), recubiertos con un baño de ácido láctico 0,15M (L.A), cobertura de quitosano (Ch10) y cobertura de quitosano con extracto lipoproteico (Ch10-PCc).

Los métodos de conservación de langostinos incluyen el empleo de compuestos que retrasan la aparición de melanosis que devalúa el producto. En los últimos años, las formulaciones más utilizadas son a base de meta-bisulfito de sodio (McEvily, Iyengar, y Otwell, 1992), si bien estos productos se han relacionado con problemas de alergias y efectos adversos en la salud (Wagner y Finne, 1986). En la búsqueda de alternativas para paliar este problema se han evaluado numerosos compuestos como antimelanósicos, entre ellos el ácido láctico, con

resultados poco prometedores (Benner, Miget, Finne, y Acuff, 1994). El quitosano también se ha utilizado como inhibidor de melanosis; sin embargo, son necesarias concentraciones superiores al 2% para obtener resultados significativos (Simpson, Gagne, Ashie, y Noroozi, 1997). La cobertura de quitosano-extracto lipoproteico (Ch10+PCc) contribuye al aumento de la vida útil de los langostinos en términos de estabilidad microbiológica y bioquímica. Sin embargo, las soluciones de quitosano disueltas en ácidos orgánicos habitualmente pueden desarrollar gustos amargos y astringencia fácilmente detectables (Hayashi, Ohara, Ganno, Ishizaki, y Yanagiguchi, 2007). Este hecho se puede producir dependiendo de la concentración y condiciones de preparación.

Durante la conservación, un panel de catadores entrenado evaluó periódicamente el sabor, olor y el aspecto del langostino, puntuando además la presencia de melanosis en cabeza y al abdomen. Los resultados del análisis sensorial indican que los recubrimientos de quitosano aumentan la aceptabilidad de los langostinos, y el sabor astringente no se detectó por los panelistas durante el periodo estudiado. De hecho, el panel entrenado no detectó sabores astringentes en las muestras, lo que indica que el recubrimiento de quitosano al 1% no fue perceptible (Fig. 35).

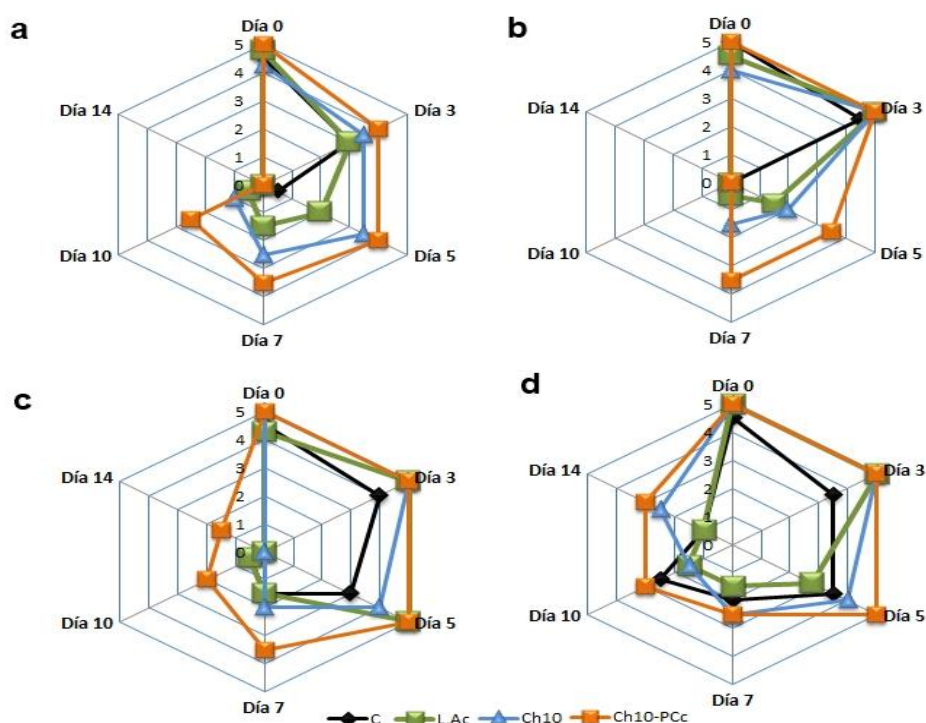


Figura 35. Resultados del análisis sensorial de langostinos sin recubrimiento (C), con baño de ácido láctico (L.Ac), cobertura de quitosano (Ch10), cobertura de quitosano y extracto lipoproteico (Ch10+PCc) durante 14 días de conservación en estado refrigerado. Parámetros: a) olor, b) sabor, c) melanosis en la cabeza y d) melanosis en el cuerpo.

El control y los langostinos recubiertos con ácido láctico fueron rechazados a los 7 días, por desarrollar olores y sabores desagradables, además de una evidente melanosis. Los resultados del panel de evaluación sensorial de langostinos mostraron que los langostinos recubiertos con Ch10 y Ch10+PCc tienen descriptores sensoriales similares a fresco hasta el día 10, obteniendo buenas puntuaciones en sabor, olor, unión de cabeza-abdomen o presencia de melanosis hasta entonces. Ambos lotes se rechazaron a los 14 días por presentar olores anómalos.

La cobertura de quitosano con el extracto lipoproteico retrasó eficazmente la aparición de melanosis y ayudó al langostino a mantener su coloración rosada y además aportó brillo. La cobertura de quitosano confirió una coloración ligeramente más pálida al langostino pero también retrasó la aparición de manchas negras. (Fig. 36).

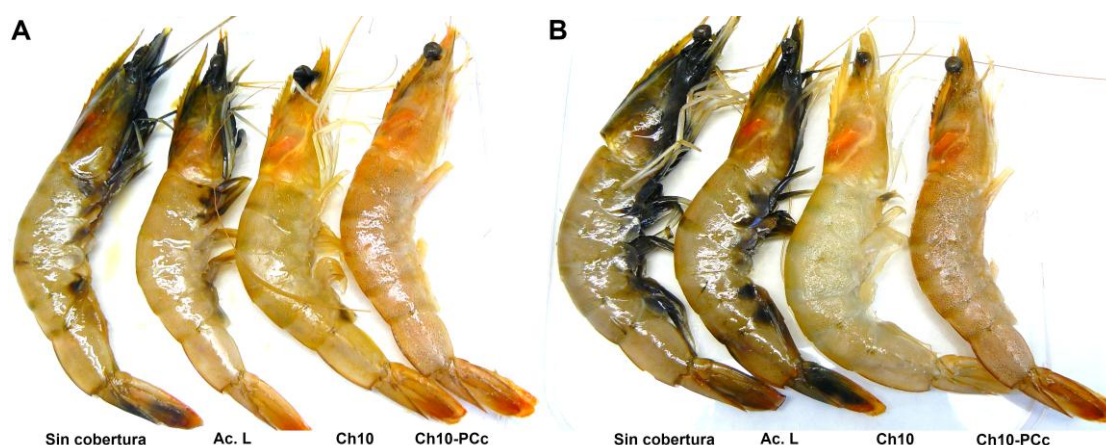


Figura 36. Apariencia de los langostinos al cabo de A) 7 y B) 14 días de conservación en estado refrigerado.

Por lo tanto, los materiales activos obtenidos a partir de residuos de langostinos son una interesante alternativa para el desarrollo de recubrimientos con capacidad antioxidante, antimicrobiana y antimelanósica (Fig. 37)



Figura 37. Aplicación y propiedades de recubrimientos comestibles.

Las películas comestibles mantienen la frescura, el sabor, la textura y el valor nutricional de los alimentos, mejoran el aspecto realzando el brillo y son especialmente útiles para frutas y verduras (Fig 38).



Figura 38. Aplicación de recubrimientos de quitosano en hortalizas (pepino y tomate cherry).

Los recubrimientos comestibles ofrecen un sinfín de aplicaciones en el campo de la conservación de alimentos.

DISEÑO Y DESARROLLO DE RECUBRIMIENTOS EN BICAPA A PARTIR DE AGAR O DE ALGINATO CON LA INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES, CARACTERIZACIÓN DE SUS PROPIEDADES Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS

El diseño de películas biodegradables puede realizarse a partir de otros recursos agroindustriales infrautilizados procedentes de diversas fuentes naturales (marinas y terrestres). Estas películas pueden activarse mediante la incorporación de aceites esenciales, derivados a su vez de cultivos infrautilizados, los cuales suelen ser efectivos antioxidantes y antimicrobianos. El empleo de aceites esenciales implica, entre otros, la selección de la matriz biopolimérica adecuada y supone además un reto desde el punto de vista tecnológico, ya que estos aceites puede exceder los niveles organolépticos aceptables por el consumidor a dosis efectivas como agentes antimicrobianos en los alimentos (Lambert, Skandamis, Coote, y Nychas, 2001). Por ello, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar recubrimientos activos con la incorporación de aceites esenciales que no afecten las propiedades sensoriales de los alimentos a los que protegen.

A partir de estos requerimientos se evaluó la actividad antimicrobiana de 13 aceites esenciales frente a 26 especies microbianas (seleccionadas por ser microorganismos responsables del deterioro de alimentos, patógenos, o beneficiosos) mediante el método de pocillo en placa de agar. Los aceites esenciales con mayor actividad antimicrobiana en este análisis cualitativo fueron el clavo, árbol de té, canela, eucalipto y tomillo. El aceite esencial de citronela resultó muy efectivo frente a los hongos *P. expansum* y *A. niger* (Fig 39). Los aceites esenciales de canela, clavo y citronela fueron objeto de estudio posterior, ya que además de actividad antimicrobiana poseen actividad antioxidante, repelente de insectos (en el caso del clavo y citronela) y antiinflamatoria (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010; Goni *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005).



Figura 39. Halos de inhibición producidos por los aceites esenciales en placas inoculadas con *L. hydrophila* (A), *B. cereus* (B), *P. expansum* (C).

Posteriormente, los aceites se incorporaron en diferentes matrices, entre otras, goma xantana, goma guar, garrofin, carboximetilcelulosa, alginato, agar, κ -carragenato, glucomanano (konjac), albumina de huevo y proteína del aislado de soja. La selección de las matrices se realizó en base a algunos parámetros, como por ejemplo, las características del biopolímero y el disolvente, los agentes plastificantes o compuestos activos, capacidad de reticulación, el efecto de la temperatura, forma de aplicación y condiciones de utilización (humedad relativa, temperatura) del recubrimiento, etc., que pueden modificar sustancialmente sus propiedades finales, tanto como su solubilidad y aspecto (Embuscado y Huber, 2009). Una película puede ser soluble o insoluble, pero sus características en definitiva dependerán de la aplicación final a la que se destine. En este contexto, una película muy soluble liberará rápidamente el compuesto activo, lo que en muchos casos puede ser beneficioso; sin embargo, cuando se utilizan aceites esenciales, este hecho puede provocar cambios irreversibles en las propiedades organolépticas del alimento.

También se evaluó el aspecto e insolubilidad de estas matrices con el fin de seleccionar las más adecuadas como soporte del aceite esencial. La matriz de agar fue la más insoluble seguida por la de alginato y proteína de aislado de soja. Las demás se descartaron, no solo por su apariencia como en el caso de la matriz de glucomanano (películas amorfas/irregulares), sino porque durante el estudio de la actividad antimicrobiana se observó que las matrices no mantenían su integridad o no favorecieron la liberación controlada de compuestos activos (Fig. 40). Por otro lado, el contacto directo del aceite esencial en la superficie del agar, si bien es una ventaja desde el punto de vista de conservación, puede representar un problema a nivel sensorial.

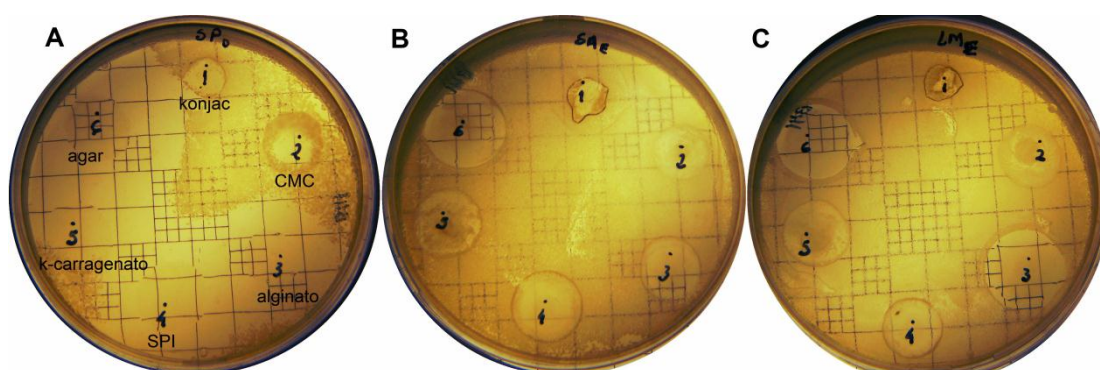


Figura 40. Halos de inhibición y estabilidad de la película al contacto con la placa de agar inoculada con A) *S. putrefaciens*, B) *S. aureus* y C) *L. monocytogenes*.

El agar ha sido utilizado para la preparación de películas debido a sus propiedades de resistencia mecánica y de barrera al agua (Giménez, López de Lacey, Pérez-Santín, López-Caballero, y Montero, 2013). Asimismo, el alginato, por sus propiedades coloidales únicas (entre las que se incluye su uso como espesante, estabilizante, de formación de película, la producción de gel y estabilizador de emulsiones) (Gacesa, 1988; King, 1983) tiene capacidad para reaccionar con cationes metálicos, iones polivalentes (específicamente calcio) y producir geles fuertes o polímeros insolubles (Grant, Morris, Rees, Smith, y Thom, 1973). La capacidad de elaborar geles irreversibles de alginato tras la adición de iones de calcio se utiliza para mejorar las propiedades de las películas, aumentando su resistencia (Pavlath, Voisin, y Robertson, 1999).

Los recubrimientos comestibles formados a partir de proteína de aislado de soja (SPI) han recibido una considerable atención debido a su excelente capacidad de formación de película, bajo coste, propiedades de barrera frente al oxígeno, lípidos y de permeabilidad de aromas en condiciones de humedad baja e intermedia (Gennadios, Weller, y Testin, 1993; Monedero *et al.*, 2010). Sin embargo, por su naturaleza hidrófila, similar a la del alginato, presenta dos desventajas principales: fragilidad al utilizarse sobre matrices muy húmedas y escasas propiedades de barrera frente a la humedad. Al igual que sucedía con el alginato, estos efectos pueden reducirse al mínimo a través de tratamientos enzimáticos, físicos, químicos o como la reticulación. Los agentes reticulantes más utilizados para las proteínas son los aldehídos básicamente glutaraldehído, formaldehído (Marquié, 2001) y glioxal (Vaz, de Graaf, Reis, y Cunha, 2003), epoxi (Patil, Mark, Apostolov, Vassileva, y Fakirov, 2000) y compuestos fenólicos (Strauss y Gibson, 2004). Sin embargo, la citotoxicidad de alguno de estos compuestos restringe su aplicación para uso alimentario en películas comestibles.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió aumentar la resistencia al agua de las matrices de alginato y soja a través de la reticulación, ya sea mediante procesos de gelificación del propio biopolímero (como en el caso del alginato) o añadiendo agentes que establezcan enlaces irreversibles con el biopolímero, como el formaldehído en el caso de la proteína de aislado de soja. Este proceso de reticulación debe ser equilibrado para conferir resistencia física a las películas sin que pierdan las características sensoriales, en el caso de los comestibles, según los requerimientos que se deseen alcanzar en el producto final. Debido al modo de reticulación aplicado en los biopolímeros, se decidió utilizar únicamente el alginato y el agar como material de partida para el desarrollo de películas comestibles. Las películas a base de SPI reticulada tendrán únicamente un fin protector pero no comestible. Asimismo y con el fin de que el aceite esencial no estuviera en contacto directo con el alimento, se planteó

el desarrollo de películas en bicapa, de modo que el aceite esencial se encuentre únicamente en la capa externa y que poco a poco difunda hacia el interior para que manifieste su actividad (por ejemplo, antimicrobiana o antioxidante) de manera prolongada en el tiempo (Fig. 41).



Figura 41. Esquema del proceso de obtención de las películas en bicapa de agar o alginato con la incorporación de aceite esencial de canela.

La incorporación de nuevas capas adicionales en una película mejoran las propiedades físicas y de barrera (ej. aumento de la resistencia a la tracción, disminución de la permeabilidad al vapor de agua y barrera al oxígeno, etc.) (Cho, Lee, y Rhee, 2010). Sin embargo apenas hay información sobre la utilización de estas películas bi o multi-capas en la conservación de alimentos. La Figura 42 muestra algunos ejemplos de liberación del aceite esencial en diferentes matrices, tanto en mono como en bicapa de agar, proteína de aislado de soja (SPI) y alginato, con y sin reticulación (R), durante el ensayo de actividad antimicrobiana.



Figura 42. Actividad antimicrobiana de las películas en mono y bicapa de agar, proteína del aislado de soja (SPI) y alginato (Alg) con y sin reticulación (R) frente a A) *Listeria monocytogenes*, B) *Escherichia coli* y C) *Staphylococcus aureus*.

Las películas resultantes fueron transparentes (Fig. 43) y vistas en sección transversal por estereomicroscopio, la matriz de agar se muestra uniforme, mientras que la de alginato presenta en su estructura burbujas de aire retenidas durante la formación del gel (Fig. 43), lo que a nivel industrial se podría evitar, por ejemplo, aplicando presión mediante sistema de rodillos. Es interesante señalar que no se observó en ningún caso la separación de las dos láminas después de la formación de la bicapa.

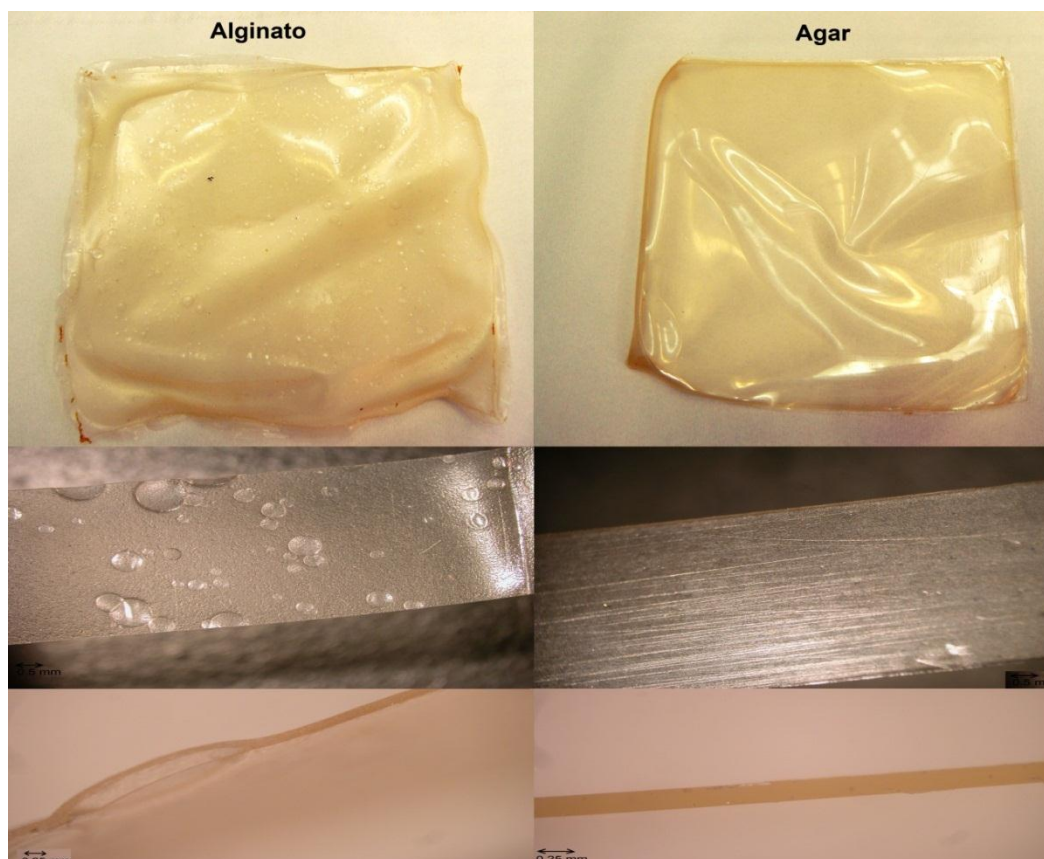


Figura 43. Aspecto, superficie y sección transversal de las películas en bicapa de alginato y agar incorporadas con aceite esencial de canela observadas al estereomicroscopio.

En las películas también se evaluó la liberación de compuestos activos a través de la capacidad antioxidante y antimicrobiana. La actividad del aceite esencial de canela está relacionada, entre otros, con sus componentes mayoritarios: cinamaldehído y eugenol (Dornier, Lallemand, Piro, y Reynes, 2000). La liberación de compuestos activos se lleva a cabo desde la capa superior externa de la bicapa con el aceite esencial de canela hasta la capa inferior y por consiguiente al alimento. La migración de estos compuestos activos y su posible difusión hacia los alimentos, especialmente aquellos de carácter hidrofílico y acuosos, se evaluó en agua

como modelo de simulación de alimento, según establece la Legislación Europea. La liberación de los compuestos fenólicos (eugenol y cinamaldehído) de las películas con aceite esencial de canela se midió a temperatura ambiente (22 °C) y en condiciones de refrigeración (4 °C) a diferentes tiempos durante 72h.

La liberación de cinamaldehído fue máxima después de 9 h en ambas películas (Figura 44) ($p > 0,05$) y entre las 24-72 h disminuyó ligeramente, probablemente debido a que este compuesto es muy volátil y se libera de la película durante las primeras horas. La liberación de compuestos activos fue superior en las películas de agar que en las de alginato, lo que indica que el agar interacciona menos con los compuestos del aceite esencial. En cuanto al eugenol, su comportamiento fue similar al del cinamaldehído con independencia de la temperatura de almacenamiento (Fig. 44). Con ambas matrices se consiguió una liberación más lenta y controlada que en otras evaluadas anteriormente, donde la liberación muestra una pauta muy diferente. Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca, y Montero, (2012) observaron que en películas de gelatina con AE de clavo, la máxima liberación de eugenol ocurre durante los primeros 45 minutos y posteriormente (hasta 16 h) no se aprecian cambios significativos. En la migración de compuestos activos a partir de matrices poliméricas influyen principalmente las propiedades del polímero, el compuesto activo y su modo de interacción, así como las características del alimento (López-de-Dicastillo, Catalá, Gavara, y Hernández-Muñoz, 2011).

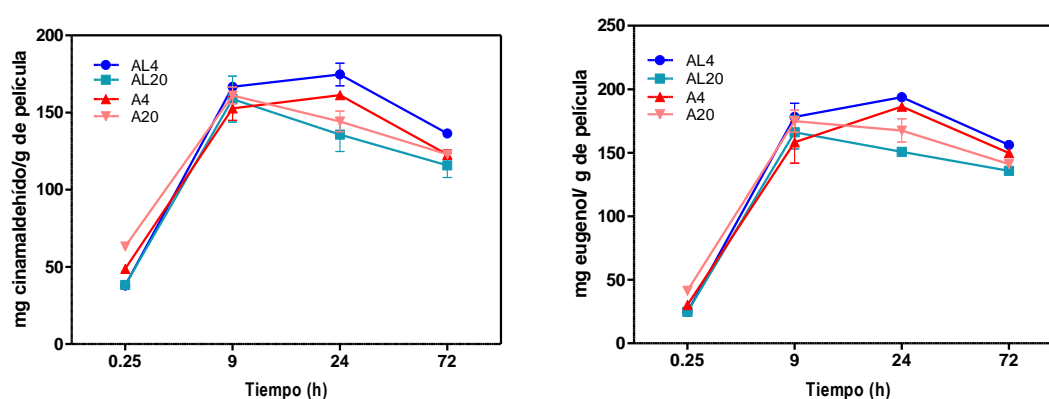


Figura 44. Cinamaldehído y eugenol liberados a partir de las películas en bicapa de agar (A) y alginato (AL) con aceite esencial de canela, a 4 °C y 20 °C.

La actividad antioxidante medida por FRAP (Figura 45a) y ABTS (Figura 45b) de las películas de agar y de alginato en agua durante 72 h aumentó en el tiempo, lo que indica un aumento en la liberación de compuestos antioxidantes en ambas matrices biopoliméricas.

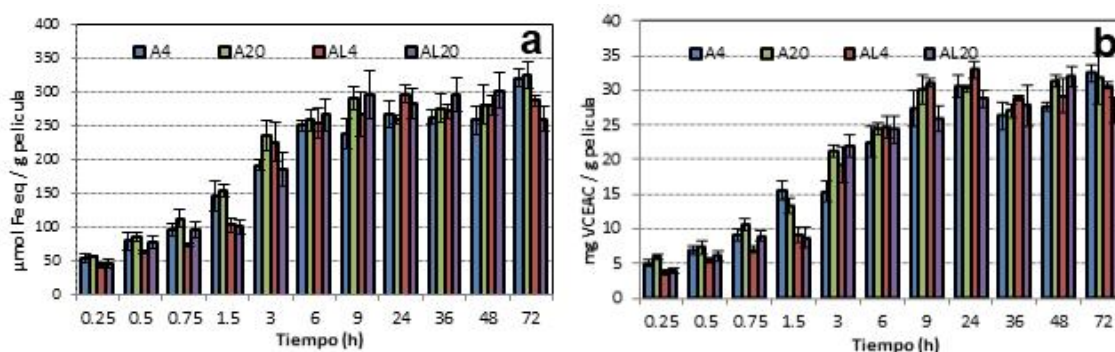


Figura 45. Capacidad antioxidante liberada por las películas en bicapa de agar (A) y alginato (AL) con aceite esencial de canela medida por a) FRAP y b) ABTS.

La actividad antimicrobiana de las películas en bicapa con aceite esencial de canela (2% p/p) cuya concentración se estableció en base resultados previos (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, y Montero, 2010), presentaron actividad antimicrobiana (Fig. 46) frente a algunos microorganismos de colección implicados en el deterioro del pescado o patógenos como son: *Escherichia coli* CECT 515, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Staphylococcus aureus* CECT 240y *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T.

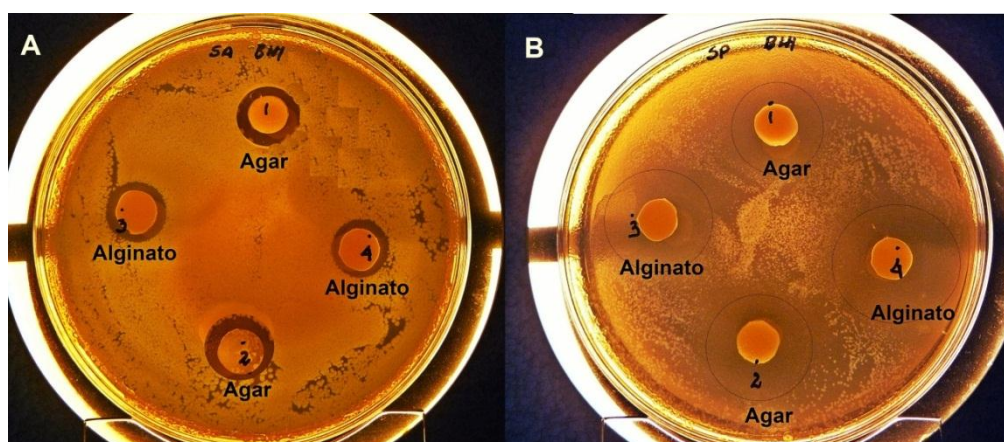


Figura 46. Halos de inhibición producidos por las películas en bicapa de alginato y agar incorporadas con aceite esencial de canela en placas inoculadas con A) *S. aureus* y B) *S. putrefaciens*.

Las películas de alginato inhibieron en menor medida el crecimiento microbiano que las películas de agar (Fig. 47). Este hecho se atribuye al grado de interacción entre el aceite esencial y la matriz biopolimérica, especialmente dado el entrecruzamiento del alginato con el cloruro de calcio (CaCl_2) que forma un gel ordenado en la estructura llamada caja de huevos, quedando atrapado el aceite esencial y por tanto dificultando su liberación. A pesar de ello, el aceite esencial de canela mantiene sus propiedades en la película bicapa y los compuestos antimicrobianos (cinamaldehído y eugenol) difunden a través de la bicapa para ejercer su actividad. La inhibición producida por el aceite esencial de canela se asocia a un efecto sobre la respiración celular y la permeabilidad de las membranas de las bacterias, cuya pérdida y la consiguiente falta de control quimiosmótico es el mecanismo más probable de su acción letal (Oussalah, Caillet, y Lacroix, 2006).

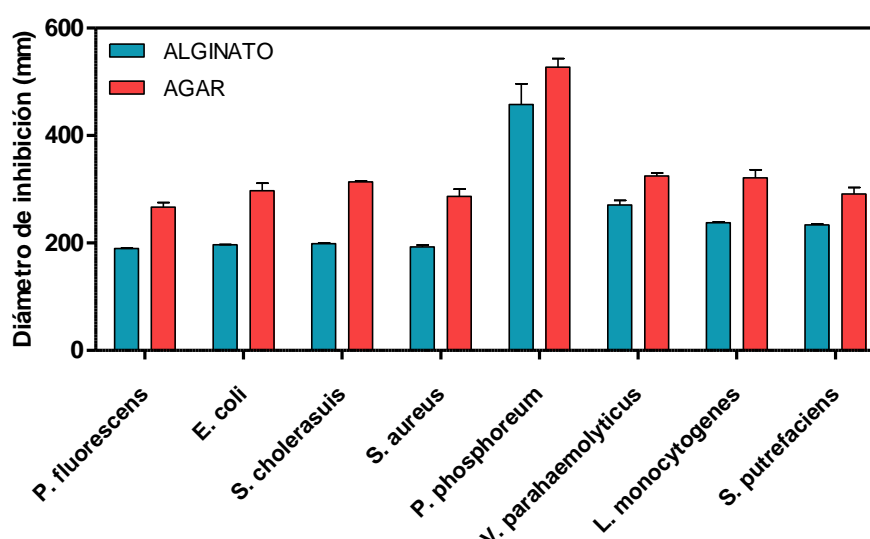


Figura 47. Actividad antimicrobiana de las películas en bicapa de agar o alginato con aceite esencial de canela.

Considerando la actividad antimicrobiana de las películas obtenidas en un sistema modelo, a continuación se planteó su estudio en alimentos. Para ello, las películas de alginato y agar en bicapa con aceite esencial de canela se aplicaron sobre colas de langostino (*Litopenaeus vannamei*) crudo pelado refrigerado a 4 °C. Estos langostinos previamente se inocularon con *L. monocytogenes* (10^4 UFC/g), con el fin de estudiar su efecto sobre esta bacteria patógena y sobre la microbiota durante la conservación en refrigeración (Fig. 48).

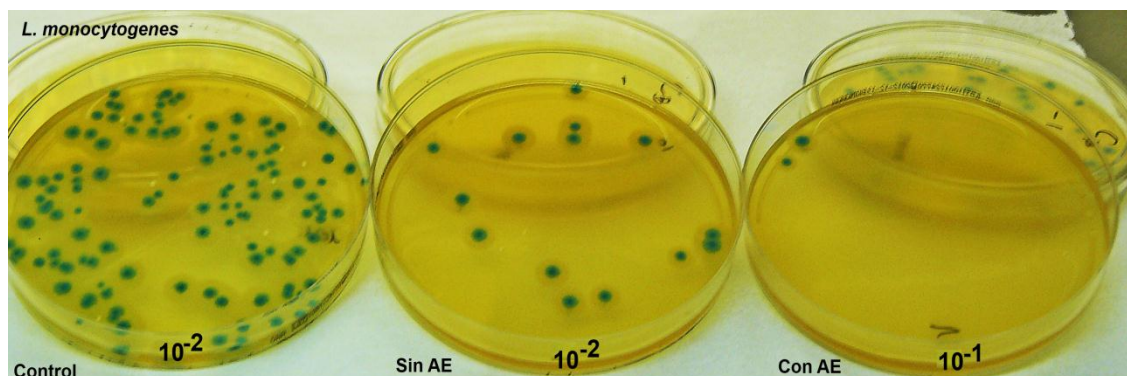


Figura 48. Langostinos inoculados con *L. monocytogenes* y cubiertos con películas bicapa de alginato con y sin aceite esencial. Recuento de *L. monocytogenes* a los 14 días de ensayo en el lote control (sin cobertura), bicapa sin AE y con AE. Números representan la dilución (-1, -2).

Los recuentos de *L. monocytogenes* en el lote control (langostinos sin película) y en el lote con película en bicapa sin aceite esencial (s/AE) se incrementan en 4 y 3 ciclos logarítmicos, respectivamente, a los 7 días de conservación. Sin embargo, en las películas con aceite esencial los recuentos disminuyeron en más de 3 ciclos logarítmicos. Este efecto fue ligeramente mayor en las películas de alginato que en las de agar.

La microbiota natural del langostino (en términos de bacterias viables totales, microorganismos aerobios mesófilos viables, colonias luminiscentes y bacterias productoras de H_2S) en las muestras control (sin cobertura) evolucionan de forma similar durante el periodo de conservación estudiado. Sin embargo, las películas en bicapa con AE de canela inhibieron en el crecimiento de estos grupos alrededor de 2 y 3 ciclos logarítmicos en las películas de agar y alginato, respectivamente. Lu, Ding, Ye, y Liu, (2010) obtienen que las coberturas de alginato con AE ($10 \mu L/mL^{-1}$) de canela demuestran excelentes propiedades antimicrobianas durante la conservación de filetes de pescado cabeza de serpiente del norte (*Channa argus*) a $4^\circ C$ durante 15 días. Sin embargo estos autores utilizan concentraciones superiores de AE de canela y no presentan una evaluación sensorial del producto.

La mayoría de los estudios de conservación de alimentos con películas a partir de distintos polímeros e incorporadas con aceites esenciales se han llevado a cabo con sistemas monocapa, como por ejemplo en melón (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, y Martín-Belloso, 2008), carne (Coma, 2008), carne curada (Ouattara, Simard, Piette, Bégin, y Holley, 2000), cerdo (Hao, Brackett, y Doyle, 1998), salsa para pasta (Bagamboula, Uyttendaele, y Debevere, 2003), salmón (Gómez-Estaca *et al.*, 2010), entre otras. Sin embargo, uno de los grandes

inconvenientes a su utilización es la modificación que producen los AE sobre las propiedades sensoriales del alimento (Seydim y Sarikus, 2006), que en muchos casos supone el rechazo del producto, o bien da lugar a un producto con aroma al aceite esencial, limitando su comercialidad. De ahí la originalidad del estudio planteado al utilizar una bicapa durante la conservación. Además, las películas en monocapa fueron considerablemente más rígidas que las elaboradas en bicapa (Fig. 49). Las películas bicapa fueron muy maleables, por lo que adoptan la forma del alimento al que recubren contactando íntimamente con él.

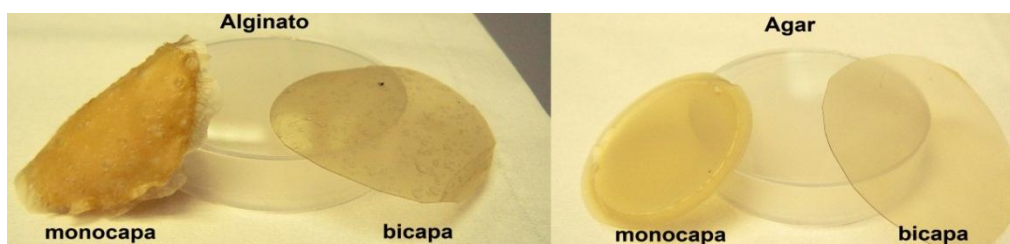


Figura 49. Películas mono y bicapa de alginato y agar con aceite esencial de canela.

Para comprobar el alcance de la aplicación de los aceites esenciales en el sistema bicapa se realizó una prueba sensorial en colas de langostino cocido, recubiertas por películas mono y bicapa con AE (Fig. 50). Los resultados mostraron que el panel de catadores no detectó sabor y olor (flavor) anómalos en los langostinos recubiertos con la película bicapa, mientras que en la película monocapa si se detectaron sabores característico del AE de canela.

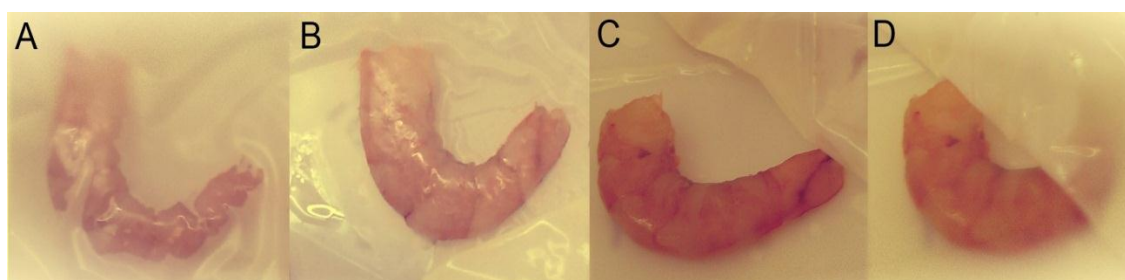


Figura 50. Apariencia de los langostinos recubiertos con películas de alginato y utilizados en la prueba sensorial A) cubierto con bicapa, B) una vez retirada la bicapa, C y D) langostinos una vez retirada la monocapa.

Posteriormente se diseñó otra aplicación, en este caso en perca del Nilo (*Perca fluviatilis*). El objetivo fue confirmar el papel de las películas bicapa sobre las propiedades organolépticas en

el pescado por la incorporación del aceite esencial mediante una escala hedónica (0 = típico, característico y 5 = no característico, extraño). Los filetes crudos recubiertos con películas de agar y de alginato, con AE en bicapa y en monocapa, revelaron que el aceite esencial en la película monocapa provocó cambios significativos en el aspecto (3) y olor (5) del pescado (Fig. 51), independientemente de la matriz utilizada. Por el contrario en los filetes recubiertos con la película bicapa el aspecto y el olor se calificaron como característicos (0,5 y 1, respectivamente). Para evaluar el sabor los filetes de perca se prepararon a la plancha. Las diferencias entre tratamientos, según las describieron los panelistas, consisten en la presencia de un sabor más intenso y empalagoso (4) de la canela al utilizar la monocapa, mientras que al utilizar la bicapa no se apreciaron sabores anómalos.

A la vista de estos resultados se desprende que la aplicación de películas en bicapa, además de minimizar el sabor característico del AE de canela, permite la liberación de los compuestos activos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana de las películas al igual que las películas en monocapa, con la ventaja de no alterar significativamente las propiedades sensoriales del producto (Fig. 51).



Figura 51. Filetes de perca cubiertos con películas mono y bicapa de alginato y agar incorporadas con aceite esencial de canela.

En este sentido la utilización de películas en bicapa abre una amplia posibilidad de aplicación de los aceites esenciales en la industria de alimentos (Fig. 52).



Figura 52. Recubrimientos de agar y de alginato en *cocina de autor*.

Además de la conservación de alimentos, estas películas tienen una función eminentemente de diseño en la cocina de autor y en algunas ocasiones pueden constituir una parte fundamental del propio alimento. La fotografía 52 ilustra algunas de las aplicaciones que incluyen tratamientos culinarios.

DISEÑO Y DESARROLLO DE PELÍCULAS EN BICAPA DE PROTEÍNA DE SOJA, LIGNINA Y ACEITES ESENCIALES CON ACTIVIDAD INSECTICIDA Y FUNGICIDA PARA SU APLICACIÓN EN AGROCULTIVOS Y EVALUACIÓN DE SU ESTABILIDAD Y BIODEGRADACIÓN

El desarrollo de envases a partir de materiales naturales y biodegradables con propiedades mejoradas mediante la incorporación de compuestos activos proporciona una valiosa oportunidad de reemplazar los plásticos convencionales derivados del petróleo, confiriendo un valor agregado a los recursos agrícolas infrautilizados y a los residuos.

La proteína de aislado de soja (SPI), a pesar de sus múltiples aplicaciones, es un recurso infrautilizado de gran potencial desde el punto de vista nutricional y tecnológico; además, es un material versátil para la obtención de recubrimientos activos y de bajo coste. Así por ejemplo, la proteína aislada de soja es un material adecuado para el desarrollo de recubrimientos biodegradables con buenas propiedades de barrera (Han y Gennadios, 2005). Sin embargo estas propiedades no son suficientes cuando se trata de ambientes húmedos debido a la alta afinidad que tiene esta proteína por el agua. Esta desventaja se puede compensar a través de la reticulación utilizando para tal fin varios agentes químicos, entre ellos el formaldehído (Marquié, 2001), o bien con la adición de lípidos, incluyendo los aceites esenciales (Morillon, Debeaufort, Blond, Capelle, y Voilley, 2002).

Los aceites esenciales, además de mejorar las propiedades de barrera, aportan propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Tradicionalmente la mayor parte de los aceites esenciales se han utilizado exclusivamente como fragancias y sabores en las industrias de perfumería y alimentos, y en la actualidad, su aplicación como agente insecticida está adquiriendo un gran interés científico. En este sentido, algunas investigaciones recientes confirman que ciertos aceites esenciales no solo son antimicrobianos, sino que además repelen insectos, con un efecto insecticida contra plagas específicas y acción fungicida contra algunos patógenos importantes de las plantas (Bhattacharyya, Bhaumik, Rani, Mandal, y Epan, 2010; Passone, Girardi, y Etcheverry, 2013; Silva *et al.*, 2008). Los compuestos mayoritarios de estos aceites esenciales (eugenol, citronelal y geraniol), poseen actividad antimicrobiana e insecticida *per se* (Huang, Ho, Lee, y Yap, 2002; Katz, Miller, y Hebert, 2008). A pesar de los trabajos publicados sobre el uso de los aceites esenciales como repelentes de insectos, su inclusión en películas biopoliméricas con actividad insecticida y/o repelente no se ha descrito previamente. En algunos estudios se presentan, la coacervación y la encapsulación con biopolímeros como una técnica para la liberación controlada de aceites esenciales con actividad insecticida (Maji, Baruah, Dube, y Hussain, 2007), pero ninguno de estos trabajos versa sobre películas con esta actividad.

Además de las propiedades activas mencionadas, el efecto de la luz UV (que implica reacciones indeseables de los radicales libres de los alimentos con el aire), también podría reducirse significativamente durante el desarrollo de recubrimientos. La eficiencia de las películas, por ejemplo, para evitar los efectos de la luz se puede mejorar mediante la adición de pigmentos o sustancias absorbentes de la luz como por ejemplo lignina (Dutta, Tripathi, Mehrotra, y Dutta, 2009; Gómez-Guillén, Ihl, Bifani, Silva, y Montero, 2007). La lignina es un polímero renovable, biodegradable, no tóxico, de naturaleza insoluble en agua pero soluble en medio alcalino ($\text{pH} > 10$). Además de hidrófobo, es un compuesto cromóforo capaz de proteger contra la radiación UV (Ban, Song, y Lucia, 2007; Pereira *et al.*, 2007), como se ha observado en películas de lignina-PVC (Mishra, Mishra, Kaushik, y Khan, 2007) y películas de lignina-gelatina (Núñez-Flores *et al.*, 2013).

En base a todo lo expuesto, en el presente trabajo se planteó como objetivo determinar la actividad insecticida del aceite esencial de clavo y de citronela incorporados en una matriz biopolimérica en bicapa, con barrera a la luz por la incorporación de lignina en una matriz a base de proteína de soja reticulada con formaldehído (Capítulo 7).

Como se indicó en el apartado anterior, la utilización de aceites esenciales en una película bicapa aporta una serie de ventajas (control de la difusión, minimizar los cambios sensoriales, etc.) y permite mantener la actividad del aceite. La Figura 53 muestra un esquema de la preparación de las películas en bicapa con la incorporación de compuestos activos procedentes de los aceites esenciales empleados.



Figura 53. Esquema de la elaboración de las películas en bicapa en base a proteína de aislado de soja reticulada (SPI-formaldehído), lignina y aceite esencial de clavo o citronela.

Las películas en bicapa pueden sufrir cambios físicos durante su desarrollo. Por ejemplo, si la adición de la segunda capa se realiza sobre una capa relativamente húmeda se consiguen superficies más uniformes (Fig. 54a), mientras que si la primera capa está seca se hidrata y da lugar a una superficie irregular (Fig. 54b). Lubarsky, Davidson, y Bradley, (2007) observaron que las películas a base de proteína de albumina de suero humano sufren cambios en sus propiedades físicas como espesor, viscosidad, densidad, módulo de Young, etc., durante los procesos de hidratación o deshidratación. Este hecho podría explicar los cambios sufridos por las películas durante la elaboración que disminuyen cuando la primera capa está poco seca, es decir, que no se ha secado totalmente antes de añadir la segunda capa.



Figura 54. Película en bicapa de SPI-formaldehído, lignina y AE de citronela: **A)** con la primera capa hidratada, **B)** con la primera capa seca.

Actualmente no existen datos publicados sobre el uso de películas biodegradables activas como agentes para el control de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*). El interés por esta especie radica en que en estado larvario se alimenta de una gran variedad de frutas provocando pérdidas cuantiosas en los cultivos (Fig. 55), (Mitchell y Saul, 1990). En el presente estudio se realizó un bioensayo para evaluar la capacidad repelente y/o insecticida de las películas; la importancia de este estudio radica en que la mosca tiene la capacidad de adaptarse a una amplia variedad de condiciones ambientales, lo que podría suponer un riesgo para las zonas aún no colonizadas. Hoy en día, el control de la mosca de la fruta se realiza casi en su totalidad con productos químicos que son perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente (Leach y Mumford, 2008). El problema se agravará cuando se trata de alimentos

orgánicos, ya que la legislación sobre agricultura orgánica prohíbe el uso de sustancias sintéticas (FAO, 2001).

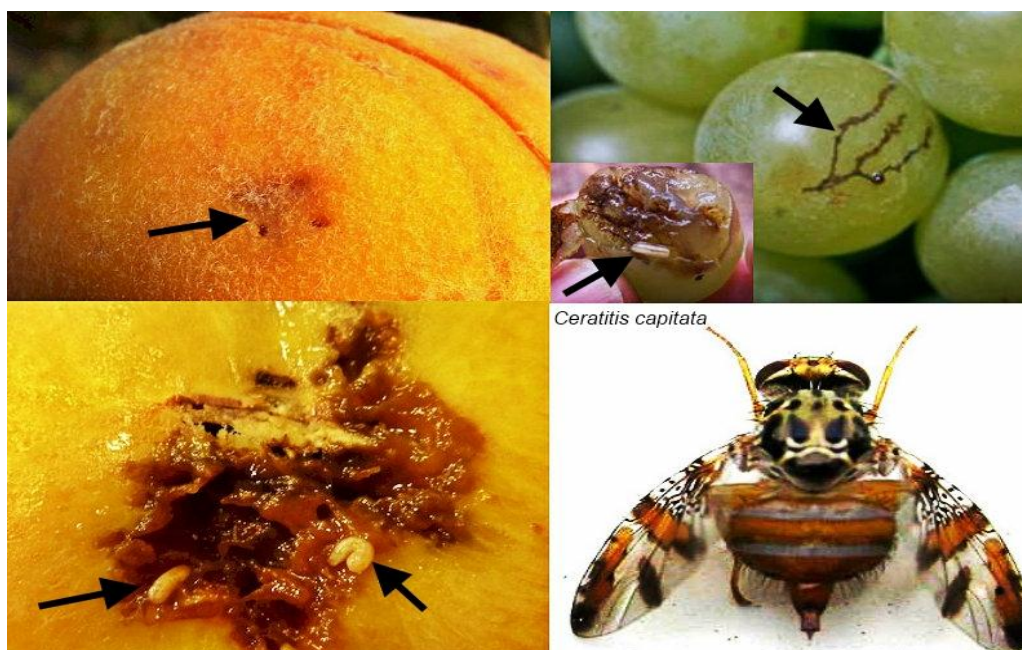


Figura 55. Apariencia de frutas con daños (flechas) por *Ceratitis capitata* (INTIA, 2011).

Para la realización del bioensayo, las películas con clavo y citronela (superficie: 4 y 36 cm²) se suspendieron en la parte superior de un recipiente y se cubrieron con una gasa para evitar que las moscas se quedaran adheridas a la película (Fig. 56).

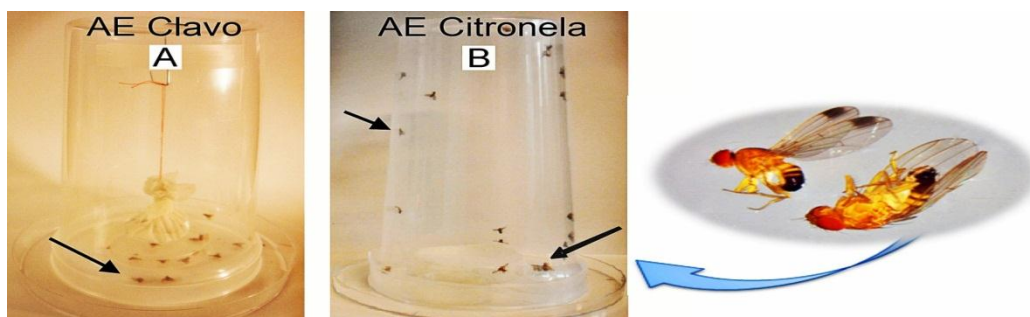


Figura 56. Cámaras experimentales para evaluar la actividad insecticida y/o repelente de las películas en bicapa de SPI-formaldehído-lignina con AE de clavo (A) y citronela (B). Las flechas muestran las moscas abatidas sobre la base (muertas) y las que se encuentran bajo un efecto anestésico (apoyadas en la pared) y que tras un tiempo recuperan su actividad.

Las soluciones de aceite esencial de clavo y citronela se ensayaron a diferentes concentraciones (1, 3, y 6%), disueltas en 1% de glicerol, para establecer el efecto de la matriz biopolimérica en la liberación de compuestos activos. A los 30 minutos, las moscas se precipitaron sobre la base y a partir de ese momento, cada hora (1, 2 y hasta 4 h.) se contabilizó el número de moscas abatidas en posición supina o aquellas incapaces de responder a estímulos mecánicos. El efecto insecticida y la mortalidad en las películas se determinaron después de 20 h de exposición (Fig. 57). La mortalidad fue mayor cuando se utilizó aceite esencial de clavo; este efecto se intensificó en la película en bicapa si se compara con el aceite disuelto en glicerol a la misma concentración. Sin embargo, el AE de citronela apenas mostró un efecto como agente insecticida menor que el clavo.

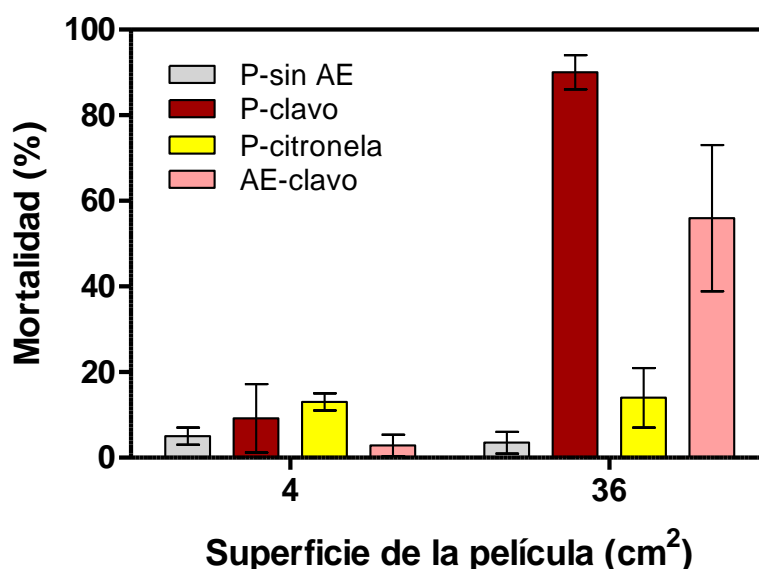


Figura 57 Mortalidad de las moscas (*Ceratitis capitata*) a las 20 h. de exposición. Películas en bicapa de SPI-formaldehído, lignina (P-sin AE), con AE de clavo (P-clavo) y citronela (P-citronela) y aceite esencial de clavo (3%) en glicerol (AE-clavo).

El efecto acumulativo que se produce tras la exposición de las moscas a las películas y a la solución de aceite esencial en glicerol fue superior con el AE de clavo que en el de citronela, tanto en película como en solución (Fig. 58). El área o superficie de muestra empleada para el experimento tiene un efecto significativo en el tiempo de exposición especialmente cuando se utilizó AE de clavo (a mayor área, mayor actividad). La actividad del AE de clavo en la película de 36 cm² se incrementa al cabo de 1h y su efecto insecticida aumenta hasta las 3 h. A partir

de ese momento alcanza una fase de equilibrio, con el ~50% de moscas abatidas en comparación con el 5% obtenido al utilizar una superficie de 4 cm² (Fig. 58A). De forma similar pero con menor actividad que el clavo, las películas de 36 cm² con AE de citronela abatieron una mayor cantidad de moscas (~5%) que las de 4 cm² (~2%) (Fig. 58B). En el caso de la citronela, el aceite en forma pura presenta mayor actividad que incorporado a la película (Fig. 58 C y D). Este hecho se atribuye probablemente a que uno o los dos compuestos activos principales (citronelal y geraniol) no se liberan adecuadamente e interaccionan con la matriz, a diferencia de lo que ocurre con el clavo, que se liberan más fácilmente.

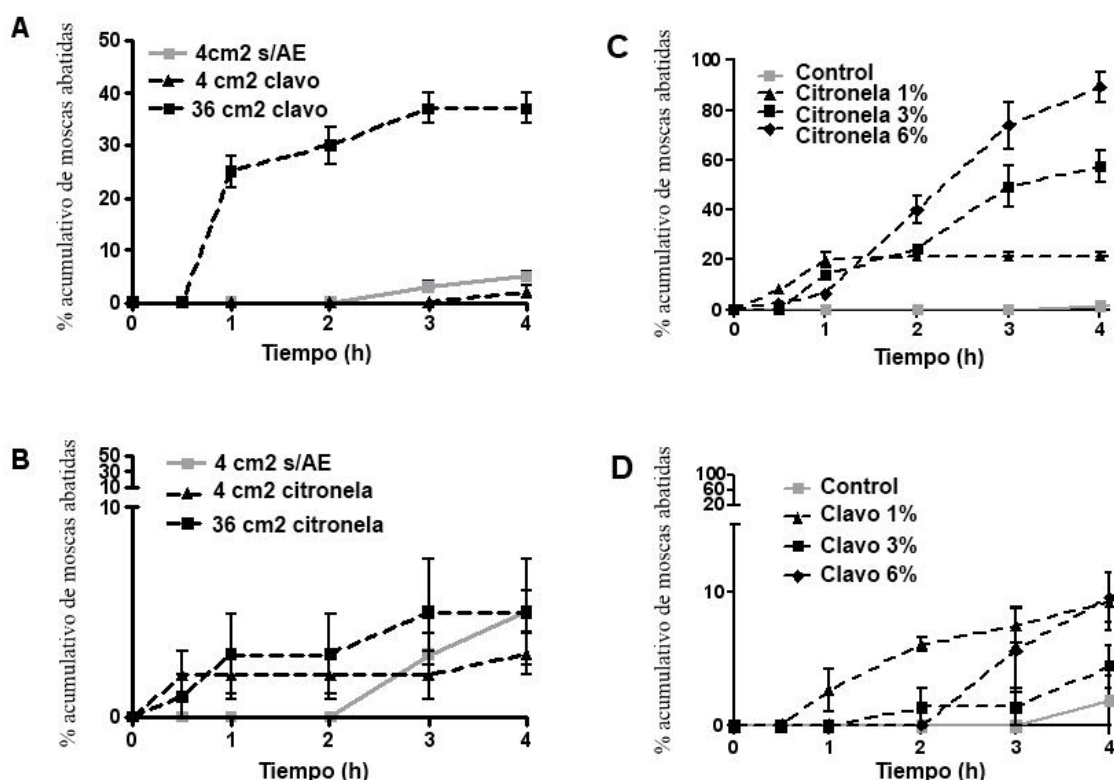


Figura 58. Porcentaje acumulado de moscas *Ceratitis capitata* abatidas. (A) películas en bicapa de SPI-formaldehído, lignina con AE de clavo 3%, (B) películas con AE de citronela 3%, (C) papel Whatman N° 3 impregnado con AE de citronela al 1, 3 y 6 % en glicerol 1% y (D) papel Whatman N° 3 impregnado con AE de clavo al 1, 3 y 6 % en glicerol 1%.

La formulación desarrollada y la metodología de la bicapa pone de manifiesto nuevas aplicaciones potenciales de las películas biodegradables para un sistema de envasado que pueda controlar la liberación de compuestos con actividad insecticida y repelente contra insectos como la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*. Sin embargo se requiere

ahondar en el uso y aplicación de los aceites esenciales como ingredientes en las formulaciones de recubrimientos para mejorar la eficacia de las películas activas, estabilidad y que además mantengan la premisa de biodegradabilidad.

Posteriormente se planteó un un segundo estudio para ahondar en el conocimiento sobre la liberación de compuestos volátiles, estabilidad y en especial la resistencia al agua. Además se evaluaron otras propiedades importantes, como es la actividad antimicrobiana, tanto en condiciones controladas como medioambientales, donde se puso en evidencia si las películas con diferentes grados de almacenaje (o “envejecimiento”) mantienen sus propiedades. Asimismo se prestó especial atención a la biodegradación de la película, con objeto de que una vez utilizada (por ejemplo, después de recubrir los frutos en el campo), se pudiera desechar en el propio suelo sin recurrir a mano de obra para su retirada. De este modo se realizaron ensayos con películas sometidas a distintos tipos y tiempos de acondicionamiento (simulando un envejecimiento en condiciones controladas y ambientales) evaluando su biodegradación.

Esta investigación se llevo a cabo con películas en bicapa incorporadas con aceite esencial de citronela previamente caracterizadas. La citronela se seleccionó por su efecto repelente de insectos en la película y sutil aroma, que no modifica las propiedades sensoriales de los alimentos a los que protege (Capítulo 8).

La liberación de compuestos activos depende de las propiedades del biopolímero y del componente activo, así como de la forma como se aplica (López-de-Dicastillo, Catalá, Gavara, y Hernández-Muñoz, 2011). En general, un compuesto activo presenta menos actividad cuando se incorpora a un recubrimiento que cuando está en solitario ya que interacciona con la matriz que los contiene (Gómez-Estaca, Bravo, Gómez-Guillén, Alemán, y Montero, 2009; Gómez-Estaca, Giménez, Montero, y Gómez-Guillén, 2009).

Por otro lado es deseable que la matriz tenga buenas propiedades de barrera al agua. Esta característica es importante durante la aplicación, ya que los envases y recubrimientos están destinados a proteger los alimentos que pueden tener una actividad de agua alta o incluso en contacto directo con ella (Gontard, Duchez, Cuq, y Guilbert, 1994). Además es importante que los envases expuestos a la interperie resistan las condiciones ambientales y sujetas a cambios climatológicos (humedad, lluvia, etc.).

Durante la prueba de resistencia al agua (Fig. 59), las películas se tornaron algo más blandas y flexibles. Sin embargo, no permitieron la filtración significativa de agua y resistieron incluso más de 30 días de exposición en el exterior.

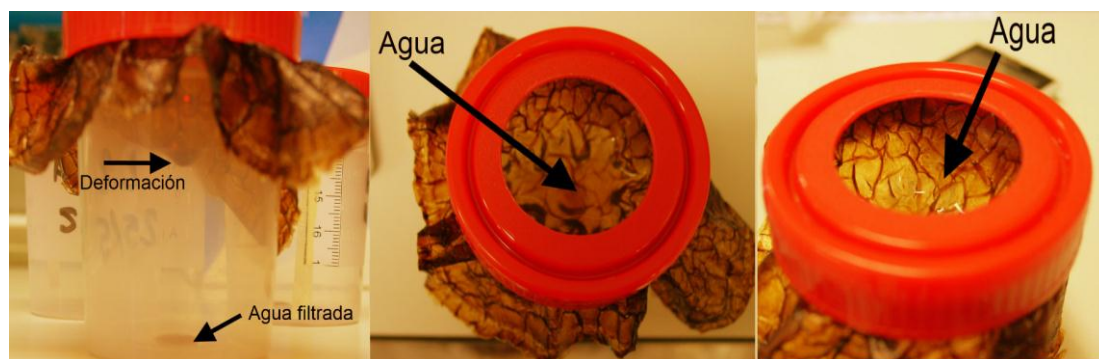


Figura 59. Prueba de resistencia al agua en películas en bicapa de SPI-formaldehído, lignina y AE de citronela.

El contenido de humedad fue alrededor de 16,52% y la solubilidad de 37,43%. Estos resultados pueden asociarse a la solubilización parcial de la lignina y la proteína de aislado de soja durante el ensayo. A pesar de ello, la adición de formaldehído juega un papel importante en la insolubilización de la película (Park, Bae, y Rhee, 2000), que mantuvo su integridad y las capas permanecieron juntas (Fig. 60) de forma similar a lo descrito en películas de proteína de soja y ácido poliláctico (Rhim, Mohanty *et al.*, 2006). Otros autores han documentado que las películas de gelatina-lignina permanecen sin cambios incluso después de estar sumergidas en agua durante 24 h (Núñez-Flores *et al.*, 2013).



Figura 60. Aspecto de las películas bicapa de SPI-formaldehído, lignina y AE de citronela durante la prueba de solubilidad

La presencia de lignina en las películas confiere barrera a la luz; la transparencia fue solo del 0,21% y los parámetros de $a^* = \sim 0,27$ y $b^* = \sim -0,38$, similares a los obtenidos en películas de gelatina con lignina (Núñez-Flores *et al.*, 2013), a la misma concentración.

La estabilidad de las películas en bicapa se evaluó mediante los cambios que sufren en el tiempo de exposición a distintas condiciones de humedad y temperatura durante seis meses. Para ello se prepararon dos lotes: uno se mantuvo a 21 °C con una humedad relativa (HR) del 58% y otro se expuso (Fig. 61) bajo las condiciones de temperatura y humedades según se describe en la Tabla 5 a condiciones ambientales.

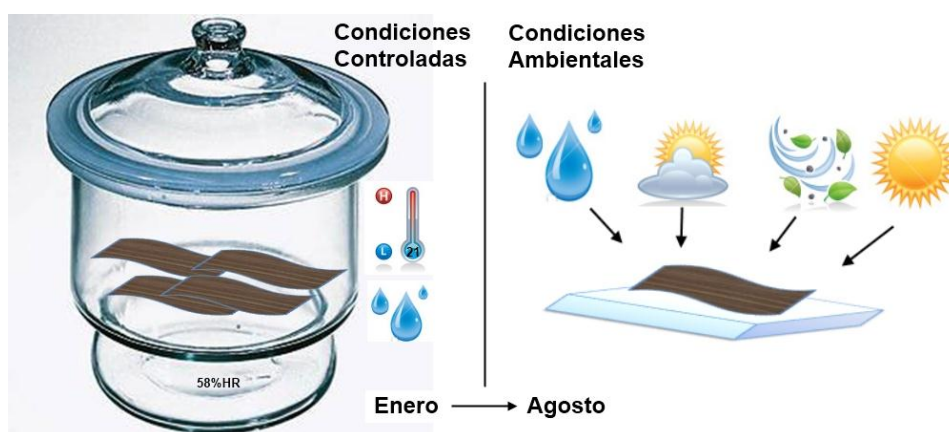


Figura 61. Esquema del acondicionamiento de las películas en bicapa.

Tabla 5. Temperatura máxima y mínima y humedad media relativa en los meses de Enero-agosto en Madrid (España) durante 2013 (AEMET, 2013).

Mes	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Humedad Relativa (%)
Enero	10,66 ± 0,56	2,66 ± 1,20	79,91 ± 11,86
Febrero	11,03 ± 1,37	2,16 ± 0,54	70,94 ± 12,97
Marzo	12,98 ± 2,82	5,29 ± 0,89	80,05 ± 10,09
Abril	17,75 ± 0,25	7,34 ± 1,14	65,78 ± 14,02
Mayo	20,64 ± 1,16	8,68 ± 1,12	59,26 ± 17,64
Junio	28,21 ± 0,51	13,89 ± 0,31	44,63 ± 17,22
Julio	34,22 ± 2,12	20,35 ± 2,75	34,41 ± 15,03
Agosto	33,90 ± 2,2	19,88 ± 2,58	35,34 ± 15,22

La espectroscopia de infrarrojo, que muestra los posibles cambios estructurales de las películas tras el acondicionamiento, reveló que las películas que se mantuvieron bajo condiciones controladas presentan mayor intensidad en la banda situada a 3280 cm^{-1} que las expuestas al aire. La reducción en la intensidad de esta banda se relaciona con la agregación proteica y la ruptura de enlaces de hidrógeno (Fig. 62a). Además, la intensidad fue menor cuanto mayor fue el tiempo de almacenamiento con independencia de las condiciones, lo que indica una fuerte agregación producto de la modificación de la película en el tiempo. En las películas con aceite esencial se observó una intensa señal del citronelal (a 2928 cm^{-1}) que se desplazó a una mayor longitud de onda en las muestras almacenadas durante 6 meses en condiciones controladas, y 3 y 6 meses en condiciones ambientales. Este hecho podría indicar una menor interacción entre el AE y la matriz en la que se incorpora o la liberación del AE de la película (Fig. 62b). Los principales picos de absorción relacionados con la amida I (estiramiento $\text{C}=\text{O}$, a 1630 cm^{-1}) y amida II (flexión NH , a 1530 cm^{-1}) fueron de mayor intensidad en las películas almacenadas a 58% de humedad, intensidad que disminuyó con el tiempo de almacenamiento (Fig. 62c). La disminución de la intensidad en el pico a 1041 cm^{-1} podría estar relacionada con la pérdida de glicerol durante el tiempo de acondicionamiento. Este comportamiento se observó durante un ensayo de pérdida de peso en resinas de proteína de soja tras sólo 1 día de compostaje (Lodha y Netravali, 2005; Martucci y Ruseckaite, 2009). Este hecho confirma que la fragilidad de las películas se relaciona con la pérdida de glicerol, especialmente en las películas expuestas a condiciones ambientales durante prolongados períodos de tiempo (Fig. 62d).

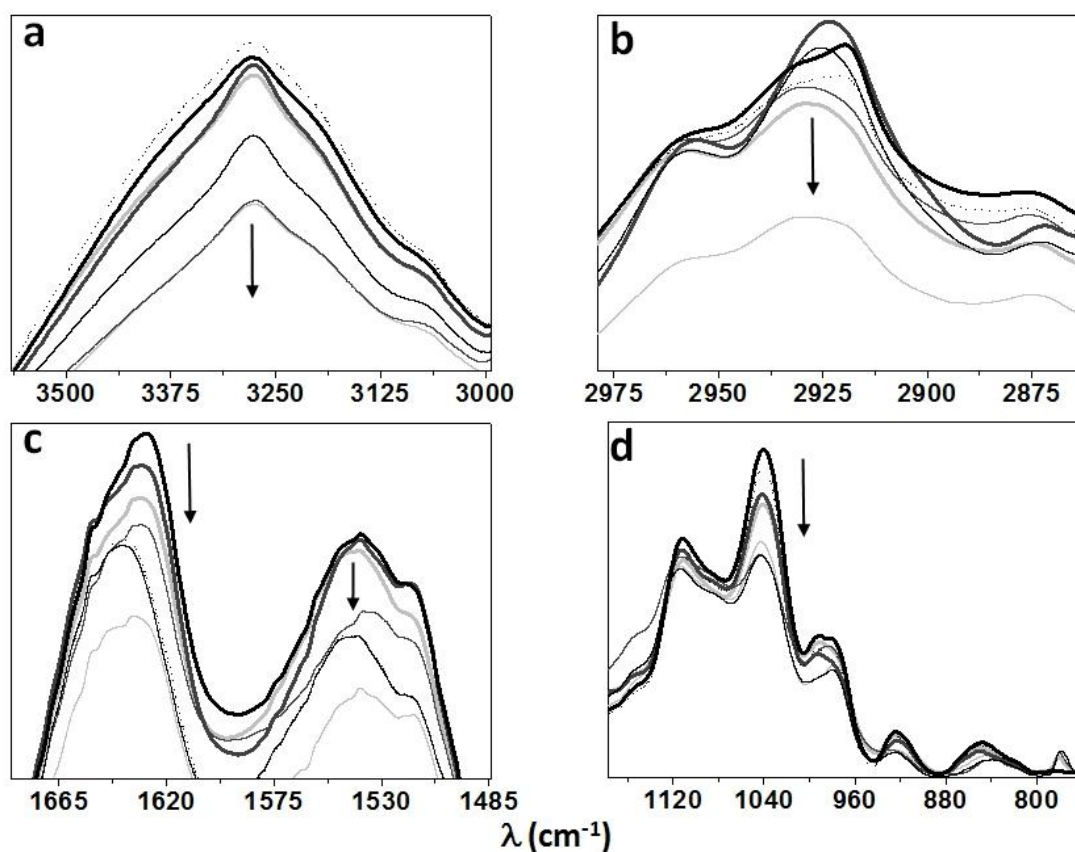


Figura 62. Imagen ampliada de los espectros FT-IR de las películas en bicapa de SPI-formaldehído, lignina y AE de citronela acondicionadas a 58% de humedad relativa (línea gruesa) y condiciones ambientales (línea delgada) durante 1 mes (líneas negras), 3 mes (líneas de color gris oscuro) y 6 meses (líneas de color gris claro). Las flechas indican una disminución de la intensidad.

La concentración de compuestos activos (citronelal y geraniol) del aceite esencia del citronela liberada de las películas durante el almacenamiento a las dos condiciones descritas anteriormente también fue objeto de estudio. Ambos compuestos permanecen en mayor medida en las películas almacenadas a 58% de HR y 21 °C que en las expuestas al aire, acentuándose esta diferencia con el tiempo. Sin embargo, a los seis meses se produce una drástica disminución en citronelal y geraniol en las películas a 58% HR (Fig. 63). En todos los casos, las películas expuestas al aire presentaron una menor concentración o liberan en menor grado citronelal y geraniol, lo que se atribuye a que los compuestos activos probablemente se evaporan por los cambios que sufre la película en el tiempo bajo las condiciones descritas (Tabla 5).

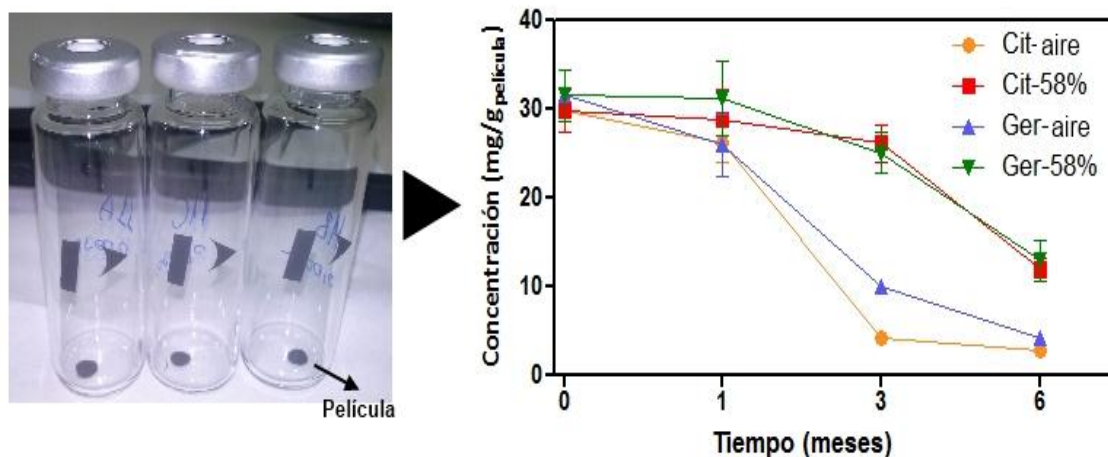


Figura 63. Película dentro del vial de recolección de volátiles (izquierda). Concentración de citronelal (Cit) y de geraniol (Ger) en la fase volátil liberada de las películas durante el acondicionamiento a 58% de humedad relativa y al aire.

La actividad antimicrobiana de las películas se evaluó frente a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Penicillium expansum* y la levadura *Debaryomyces hansenii*. Estas especies se seleccionaron por su implicación en el deterioro de frutas, verduras y plantas frutales (Fig. 64) y la levadura por ser una antagonista efectiva en post-cosecha.

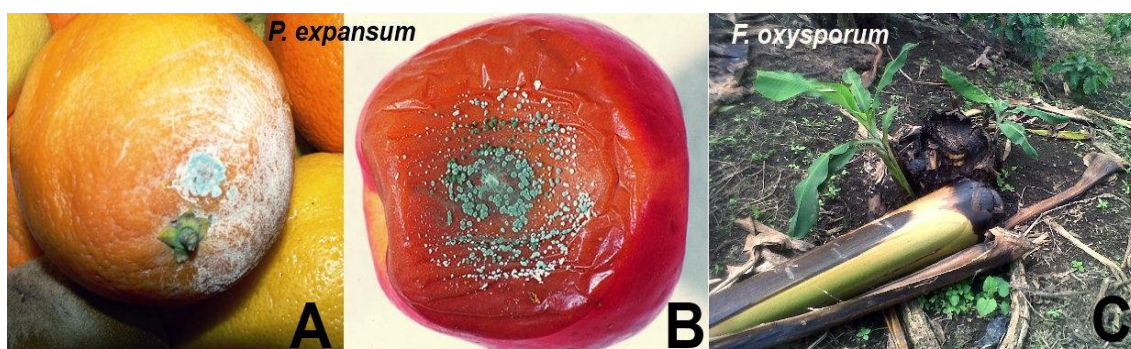


Figura 64. Daños provocados por *P. expansum* en frutas: A) naranja y B) manzana, C) daños en las raíces de una planta del género *Musa* (plátano) por *F. oxysporum*.

Con independencia de las condiciones de almacenamiento, las películas resultaron antimicrobianos efectivos frente a *F. oxysporum*, si bien la actividad disminuye con el tiempo. Únicamente las películas mantenidas a 58% HR presentaron actividad frente a *P. expansum*,

siendo la actividad frente a este hongo nula en las películas expuestas al aire. Estos resultados se atribuyen a la actividad antifúngica del aceite esencial de citronela y sus compuestos mayoritarios (citronelal y geraniol) (Tzortzakis y Economakis, 2007), y a su menor concentración con el paso del tiempo (Fig. 60). Ninguna de las películas ensayadas presentó actividad frente a *D. hansenii*.

El interés por *F. oxysporum* radica en que este hongo del suelo ataca a las plantaciones de la mayoría de los países productores de plátanos, provocando el famoso “mal de Panamá”, este microorganismo origina pérdidas cuantiosas en cosechas debido a que se propaga rápidamente a través de la raíz para atacar el sistema vascular de la planta. El control químico del hongo es poco eficiente y no existen métodos biológicos viables ni variedades comerciales de plátano resistentes al hongo, por lo que las medidas preventivas son tradicionalmente las más efectivas para evitar esta enfermedad. De ahí la importancia de los resultados obtenidos con las películas en bicapa con AE de citronela.

Una vez demostrada la efectividad de las películas frente a *F. oxysporum* en sistema modelo, el siguiente paso fue comprobar si las películas mantenían su actividad aplicadas en alimentos. Así se inocularon láminas de manzana con el hongo a las que se aplicó discos de películas bicapa con el AE de citronela. La actividad antifúngica de la película fue evidente; en la manzana se puede apreciar una parte invadida por el hongo (derecha) mientras que en la otra (izquierda) no se evidencia la contaminación (Fig. 65). También se comparó la efectividad del aceite esencial (líquido) y del aceite esencial incorporado a una película bicapa frente a *F. oxysporum*. La actividad antifúngica fue mayor en la película, probablemente porque el AE permanece más tiempo que cuando se aplica como líquido, donde es más fácil su evaporación.

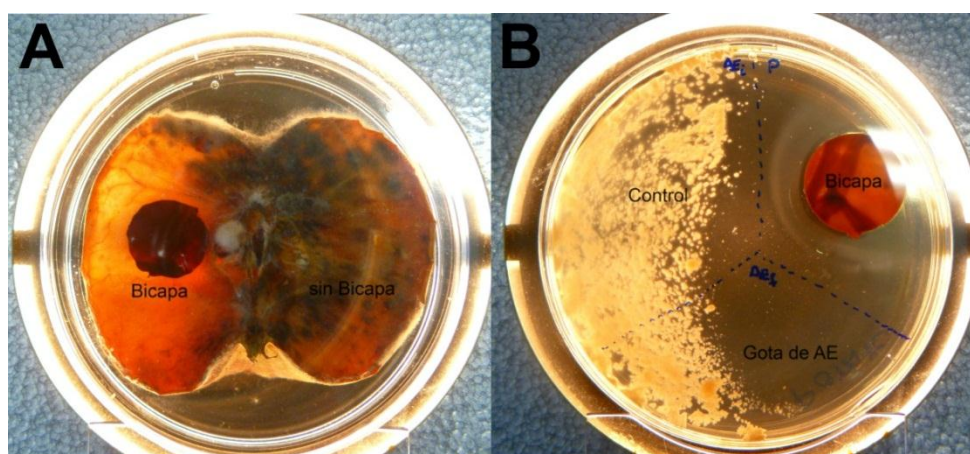


Figura 65. Actividad fungicida de una película bicapa de SPI-formaldehído, lignina con AE de citronela frente a *F. oxysporum*. **A)** en rodaja de manzana; **B)** en placa de agar.

En base a estos resultados, se consideró de gran interés realizar un estudio con plátanos, que se recubrieron con las películas objeto de estudio para simular el efecto del material plástico que cubre los frutos en las plantaciones.

Las películas (bicapa con y sin aceite esencial de citronela) se microperforaron y dispusieron cubriendo los plátanos (dejando un espacio entre ellos para evitar el contacto directo entre la bolsa y el fruto) y se mantuvieron a 15 °C durante 6 días. Los plátanos sin cobertura se utilizaron como control (Fig. 66). Durante este periodo se realizaron ensayos microbiológicos y de color en los plátanos.



Figura 66. Plátanos recubiertos con películas (SPI-formaldehído-lignina-citronela) a los 3 días de conservación.

Los recuentos de mohos y levaduras de la parte comestible mostraron que la aplicación de las películas con citronela respecto al plátano conservado de forma convencional (> 2 unidades logarítmicas). El lote recubierto con película sin aceite esencial registró valores intermedios (Fig. 67A). Respecto a los microorganismos mesófilos totales viables, apenas se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p \leq 0,05$) hasta el día 6. Las películas parecen ejercer un efecto bacteriostático y únicamente se aprecia un incremento en los recuentos del lote control (sin recubrir) (Fig. 67B). En ambos tipos de microorganismos, el efecto antimicrobiano fue más evidente al final de la conservación ($p \leq 0,05$).

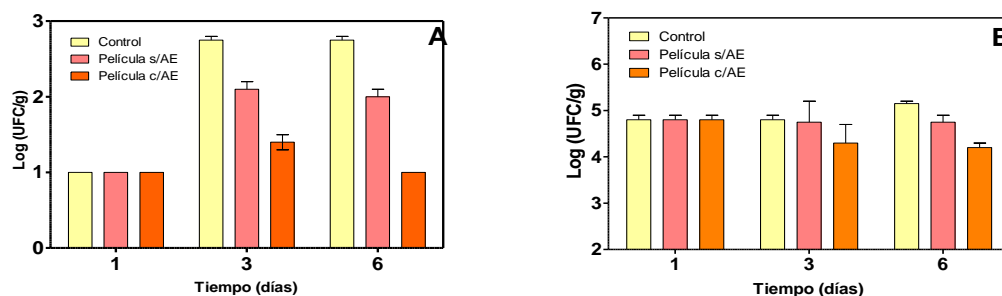


Figura 67. Recuento de microorganismos **A)** mohos y levaduras, **B)** microorganismos aerobios mesófilos viables en plátanos sin recubrimiento (control), recubiertos con películas de SPI-formaldehído y lignina sin AE (s/AE) y con AE (c/AE).

Con independencia de su composición y si bien las películas se perforaron para simular el envase plástico con el que se comercializan los plátanos, el efecto bacteriostático en los recuentos puede estar también asociado a la disminución en la tasa de transferencia de oxígeno y reducción de la permeabilidad a los gases, y por tanto a un acúmulo de etileno. Las películas, en especial las de proteínas reticuladas, reducen la permeabilidad al oxígeno (Miller y Krochta, 1997). Las películas en bicapa con AE de citronela no estuvieron en contacto directo con los plátanos, pero presentaron actividad antimicrobiana a través de los compuestos activos volatilizados, tal como describe (Passone, Girardi, y Etcheverry, 2013). Además, la concentración de citronelal y geraniol de las películas objeto de estudio es suficiente para producir un efecto antifúngico a través de los compuestos volátiles mayoritarios (Sellamuthu, Sivakumar, y Soundy, 2013). Durante el ensayo, los plátanos presentaron cambios de color debido al proceso de maduración (Fig. 68). En todos los lotes el color de la piel cambió del verde inicial al amarillo (Fig. 68), y en general el valor L^* evoluciona de forma semejante ($p \leq 0,05$).

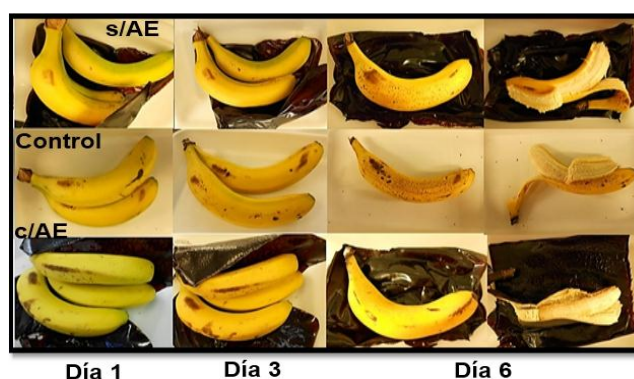


Figura 68. Cambios de coloración en plátanos control: sin película; s/AE: con película bicapa sin aceite esencial y c/AE: bicapa con aceite esencial

Los valores de a^* permanecen muy por debajo del lote control (sin recubrir) en el lote recubierto con la película y aceite esencial al final del ensayo, mientras que la película sin aceite se comporta de forma semejante al lote control (Fig. 69). El valor b^* sigue una tendencia similar al de a^* y al final del experimento, los plátanos cubiertos con la película en bicapa y con aceite esencial presenta los valores más bajos (Fig. 69). Los cambios en la coloración se relacionan con la liberación de compuestos activos de la película. Algunos estudios indican que la calidad postcosecha se puede mejorar cuando los alimentos (fresas y tomates) se exponen a vapores de aceites esenciales de canela y eucalipto (Tzortzakakis *et al.*, 2007).

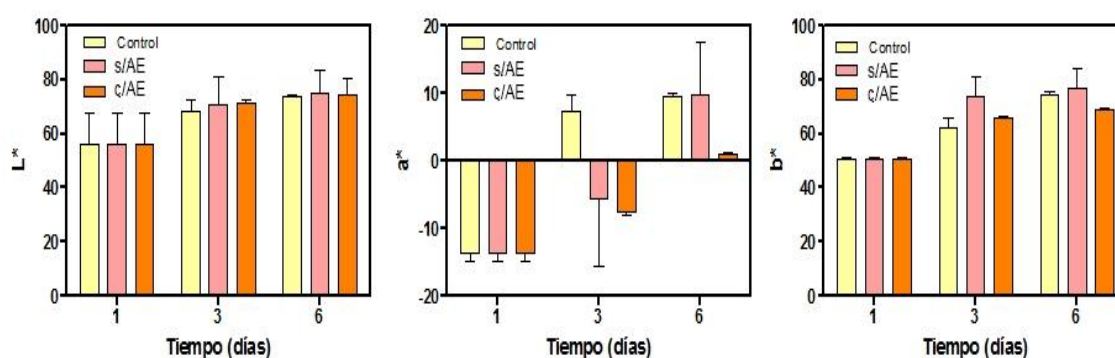


Figura 69. Cambios en los parámetros L^* , a^* y b^* durante el ensayo de plátanos: sin película (control), bicapa sin aceite esencial (s/AE) y bicapa con aceite esencial (c/AE).

Con el objeto de conocer si la aplicación de las películas confería olores/sabores anómalos a los plátanos se realizaron pruebas triangulares (plátanos cubiertos con película bicapa y aceite esencial *versus* plátano control sin cobertura). Los resultados revelan que no se detecta ninguna diferencia entre las muestras. (Fig. 70), por lo que la aplicación de estas películas resulta muy prometedora.



Figura 70. Plátanos cubiertos con la bicapa con AE y control utilizados en la prueba triangular a los seis días de conservación.

Las películas activas en bicapa de proteína de soja-formaldehído-lignina y aceite esencial de citronela son una excelente barrera a la luz. A pesar de que se diseñan en bicapa, las películas permiten la liberación de compuestos activos a través de la capa externa con AE en forma de volátiles, por lo que las propiedades antimicrobianas e insecticidas no se pierden. Las ventajas que presenta el uso de una bicapa frente a una película monocapa dependerán de la finalidad última del envase. En este caso concreto interesa que la capa interna sea muy poco porosa para mantener la calidad del fruto y la capa externa manifieste sus propiedades activas fungicidas e insecticidas. Ya sea bicapa, monocapa o multicapas, el que estos envases puedan desecharse al ambiente y finalmente biodegradarse constituye además de ventaja, un valor añadido.

Los estudios de biodegradación han surgido a raíz de la amenaza potencial que representan los plásticos sintéticos al medio ambiente. La compactación, incineración e incluso el reciclaje han sido evaluadas como tecnologías alternativas a la eliminación de los plásticos a pesar de todos los problemas que conlleva su aplicación. Por ejemplo, la incineración a alta temperatura es un proceso satisfactorio con la mayoría de los plásticos, pero el coste es alto, sobre todo cuando los polímeros clorados están involucrados (Scott, 1990). Además ello supone un presupuesto previo para la recogida de residuos. Por otro lado, los subproductos de la actividad agrícola y la industria agrícola en los últimos años han crecido considerablemente, en especial por la implementación de nuevas tecnologías como el uso de películas plásticas para la protección de cultivos ("mulching"). Ninguno de los plásticos para envasado son biodegradables; en general son materiales hidrófobos, lo que explica en gran parte su éxito como barrera al agua (Scott, 1990). Actualmente se estudia la aplicación de mezclas de polímeros sintéticos y naturales biodegradables y una alternativa puede ser el empleo de películas de biopolímeros que sean biodegradables y activos.

Con el uso excesivo de los plásticos y la presión por parte de las autoridades para una correcta eliminación de los residuos generados, la necesidad de plásticos biodegradables y la biodegradación de los residuos sintéticos es una realidad. La conciencia de la problemática de los residuos y su impacto en el medio ambiente abre las puertas a la aplicación de polímeros degradables. Además, cada vez hay más demanda por el desarrollo de materiales que no se conviertan en una carga significativa para el medio ambiente (Shah, Hasan, Hameed, y Ahmed, 2008). El aumento de la producción y la falta de biodegradación de los polímeros comerciales (en especial los plásticos utilizados en el envasado de alimentos), centra la atención en la contaminación y en su persistencia durante siglos (Albertsson, Andersson, y Karlsson, 1987; Bonhomme *et al.*, 2003). En la Figura 68 se presentan algunos de los materiales más utilizados

por el hombre y el tiempo que tardan en biodegradarse en el ambiente. A modo de ejemplo, el papel producido a partir de la celulosa se degrada relativamente rápido, pero otros materiales (botellas, bolsas plásticas, etc.) necesitan más de 100 años para ello. Obviamente la mayoría de los polímeros pueden degradarse en cierta medida (en el entorno apropiado, en la concentración correcta, etc.), aunque para este conocimiento son necesarios aún muchos años de estudios en profundidad.



Figura 71. Tiempo de biodegradación estimado para diversos materiales.

Los estudios de biodegradación son de gran importancia a nivel agroindustrial, ya que en las plantaciones, por ejemplo de plátano, se generan gran cantidad de residuos plásticos al utilizar bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE) teñidas en azul para proteger los racimos de la luz y el ataque de insectos. Las bolsas que rodean la fruta durante su desarrollo se fumigan además por el interior y exterior para reducir el daño por plagas (Fig. 72). El problema es que muchos de los insecticidas y fungicidas químicos también contaminan el aire y el suelo. Para

reducir el uso de estos pesticidas y otros productos agroquímicos en los cultivos de plátanos y bananas, la aplicación de películas biodegradables con aceites esenciales podrían ser una buena alternativa y por ello es necesario conocer su comportamiento una vez se desechan.



Figura 72. Detalle de las bolsas empleadas para recubrir racimos de plátano. A la derecha se pueden apreciar las perforaciones que tiene la bolsa para permitir la respiración de la fruta y en la parte inferior los desechos generados tras su utilización (Agrocabildo, 2010).

Las películas con la misma formulación que las utilizadas en ensayo de conservación del plátano (SPI-lignina-AE) se acondicionaron a 58% HR durante 1, 3 y 6 meses y se sometieron a un ensayo de biodegradación. Para ello, estas películas con distinto tiempo y condiciones de almacenamiento (o “envejecimiento”) se dispusieron sobre tierra y se regaron con agua cada dos días simulando una llovizna durante 1 mes (Tabla 5). Se eligieron los meses de verano (julio-agosto) para simular las condiciones de temperatura y humedad en las que se encontraría una platanera. Las películas se pesaron al inicio y al final del experimento y visualmente se siguió la evolución durante el periodo de experimentación (Fig. 73).

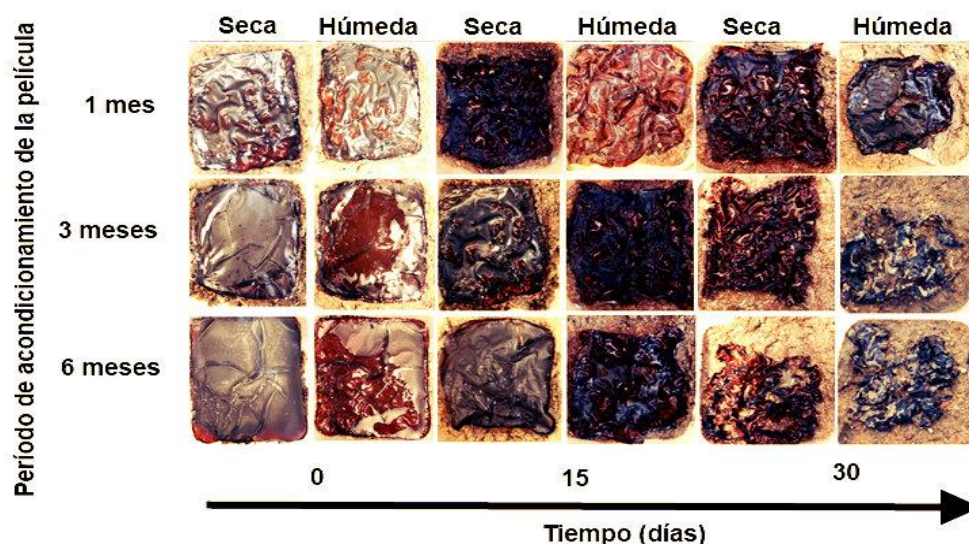


Figura 73. Aspecto de las películas depositadas en la tierra después del almacenamiento a 58% de humedad relativa por 1, 3 y 6 meses.

Al final del ensayo todas las películas sufrieron una pérdida de peso de alrededor del 30% ($p \leq 0,05$). Este hecho se atribuye a la pérdida de compuestos solubles como el glicerol, la proteína con bajo grado de reticulación (debido a los fenómenos de “lavado” por el agua), y también a otros factores como la actividad microbiana, degradación enzimática, etc., al estar en contacto con la tierra. Lodha y Netravali, (2005) observaron un comportamiento similar en películas de proteína de soja sin reticulación. La reticulación o entrecruzamiento protege de cierta manera a las películas de la degradación al hacerlas más estables; por ello, las películas de proteína de soja sin reticulación presentaron una pérdida de peso de entre el 50 al 90%. Martucci y Ruseckaite, (2009) describen que por otro lado las películas multicapa de gelatina reticulada perdieron un 30% de peso durante la biodegradación. De acuerdo a los resultados del presente estudio, las películas obtenidas se degradan en aproximadamente 30 días (Fig. 74).



Figura 74. Aplicaciones y biodegradación de películas en bicapa aplicadas en agroalimentación

Estas películas barrera a la luz y al agua, con propiedades activas (antioxidantes, antimicrobianas y repelentes), que contribuyen a aumentar la vida útil de los alimentos y biodegradables, representan un sistema prometedor para aplicación en agronomía.

VIII. Conclusiones

1. El aprovechamiento integral de los residuos de crustáceos dio lugar a la obtención de materiales con alto valor funcional como quitosano, concentrados e hidrolizados de naturaleza lipoproteica y carotenoides.
2. La obtención de quitosano a partir de la cutícula de crustáceos se optimizó mediante un método químico suave y más respetuoso con el medio ambiente con la recuperación total de proteína (41% de la cutícula), a través de la desproteínización con alcalasa y viscozyme y la desacetilación con una reducción desde el 12,5 M al 2,5 M de NaOH (80% en peso)
3. Los diversos procesos de extracción dan lugar a quitosanos que destacan por su capacidad filmogénica y antimicrobiana. Los materiales activos ricos en proteína, lípidos y carotenoides son aditivos versátiles en la formulación de recubrimientos en base a quitosano, manteniendo o incluso mejorando su actividad antioxidante y antimicrobiana, tanto en solución filmogénica como en películas y coberturas.
4. Las coberturas en base a quitosano obtenido con el método químico suave y la incorporación del concentrado lipoproteico mejora la calidad microbiológica, retrasa la aparición de melanosis, no se detecta sensorialmente y aumenta en un 30% la vida útil de langostinos durante su conservación en estado refrigerado.
5. El desarrollo de películas bicapa de agar o de alginato permiten la difusión de los compuestos antioxidantes y antimicrobianos del aceite esencial de canela hacia el alimento minimizando los cambios en sus atributos sensoriales e inhiben eficazmente a *Listeria monocytogenes* y a los microorganismos del deterioro durante la conservación de langostinos crudos en estado refrigerado.
6. Las películas bicapa con proteína de aislado de soja reticulada y lignina con aceite esencial de clavo o citronela permiten una marcada difusión de compuestos bioactivos volátiles, ejerciendo un efecto repelente y además una acentuada actividad insecticida con el aceite esencial de clavo frente a la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*.
7. Las películas bicapa de proteína aislada de soja y lignina con aceite esencial de citronela inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, y mantienen esta actividad después de seis meses de almacenamiento, tanto expuestas a condiciones ambientales como controladas (58% HR, 21 °C), además son excelente barrera a la luz y al agua, no modifican las propiedades organolépticas cuando se aplican sobre plátanos (*Musa acuminata* Colla AAA) y son biodegradables en el medio ambiente en 30 días.

Conclusión general

La estrategia seleccionada para el diseño y desarrollo de recubrimientos activos en mono o bicapa depende del biopolímero, material activo y el fin al que se destine, diversificando su funcionalidad y aplicación. Esta estrategia permite valorizar recursos infrautilizados o residuos de la industria con capacidad filmogénica, poder antioxidante, antimicrobiano e insecticida que no alteran las propiedades organolépticas de los alimentos y son altamente biodegradables una vez desechados.

IX. Referencias bibliográficas

- A.O.A.C. (2000). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry. In. Maryland, USA.
- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry. In. Maryland, USA.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International journal of food science & technology*, 47(4), 847-853.
- Abdou, E., Nagy, K., & Elsabee, M. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367.
- Abrusci, C., Marquina, D., Santos, A., Del Amo, A., Corrales, T., & Catalina, F. (2007). A chemiluminescence study on degradation of gelatine: Biodegradation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 185(2), 188-197.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*: Allured Publishing Corporation.
- AEMET. (2013). Resumen de variables meteorológicas. Agencia Estatal de Metereología. www.aemet.es [Consulta: sabado, 19 de octubre de 2013]
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28.
- Agrocabildo. (2010). Evaluación del embolsado de racimos de plátanos como barrera física frente a pulverizaciones insecticidas. In. en http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/subt_354_embolsado.pdf [Consulta: martes, 19 de noviembre de 2013]
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Aiedeh, K., & Taha, M. O. (2001). Synthesis of iron-crosslinked chitosan succinate and iron-crosslinked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 159-168.
- Albertsson, A.-C., Andersson, S. O., & Karlsson, S. (1987). The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 18(1), 73-87.
- Aleman, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.
- Altmann, H.-J., Grunow, W., Mohr, U., Richter-Reichhelm, H., & Wester, P. (1986). Effects of BHA and related phenols on the forestomach of rats. *Food and chemical toxicology*, 24(10), 1183-1188.
- Alvarado, J. D., Almeida, A., Arancibia, M., Carvalho, M. A., Sobral, P. J. A., and Habitante, A. M. (2007). Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables. *Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada*, 64, 605-611.
- Allan, C. R., & Hadwiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3(3), 285-287.
- Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Repellency effect of forty-one essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex mosquitoes. *Parasitology research*, 99(4), 478-490.
- Andoğan, B., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Özbaşar, D., & Mumcu, E. (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 860-864.

- Antonacopoulos, N., & Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: a third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 189(4), 309-316.
- Aoudou, Y., Léopold, T. N., Michel, J. D. P., Xavier, E. F., & Moses, M. C. (2010). Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *J Yeast Fung Res*, 1, 1-8.
- Araki, Y., & Ito, E. (1975). A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii*. *European Journal of Biochemistry*, 55(1), 71-78.
- Arancibia, M., Rabossi, A., Bochicchio, P. A., Moreno, S., López-Caballero, M. E., Gómez Guillén, M. d. C., & Montero, P. (2013). Biodegradable Films Containing Clove or Citronella Essential Oils against the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Agriculture and Food Technology*, 3(3), 1-7.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Carmen Gómez-Guillén, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717.
- Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Peniche, C., & Higuera-Ciajara, I. (1998). Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system. *Polymer Gels and Networks*, 6(6), 429-440.
- Armenta-López, R., Guerrero, I., & Huerta, S. (2002). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of food science*, 67(3), 1002-1006.
- Armenta, R. E., & Guerrero-Legarreta, I. (2009). Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry*, 112(2), 310-315.
- Atarés, L., De Jesús, C., Talens, P., & Chiralt, A. (2010a). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 384-391.
- Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010b). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687.
- Austin, A. T., & Ballaré, C. L. (2010). Dual role of lignin in plant litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4618-4622.
- Azmi, S., Srivastava, S., Mishra, N. N., Tripathi, J. K., Shukla, P. K., & Ghosh, J. K. (2013). Characterization of antimicrobial, cytotoxic, and antiendotoxin properties of short peptides with different hydrophobic amino acids at "a" and "d" positions of a heptad repeat sequence. *Journal of medicinal chemistry*, 56(3), 924-939.
- Babu, C. M., Chakrabarti, R., & Surya Sambasivarao, K. R. (2008). Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT-Food Science and Technology*, 41(2), 227-235.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M., & Devere, J. (2003). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection*, 66(4), 668-673.
- Bai, H., Xu, J., Liao, P., & Liu, X. (2013). Mechanical and water barrier properties of soy protein isolate film incorporated with gelatin. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 29(2), 174-188.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Ban, W., Song, J., & Lucia, L. A. (2007). Influence of Natural Biomaterials on the Absorbency and Transparency of Starch-Derived Films: An Optimization Study. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(20), 6480-6485.
- Banerjee, R., & Chen, H. (1995). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 78(8), 1673-1683.

- Barros, M. C., Bello, P. M., Bao, M., & Torrado, J. J. (2009). From waste to commodity: transforming shells into high purity calcium carbonate. *Journal of Cleaner Production*, 17(3), 400-407.
- Bautista, J., Jover, M., Gutierrez, J. F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E., Iglesias, F., & Vega, J. (2001). Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production. *Process Biochemistry*, 37(3), 229-234.
- Beaney, P. D., Gan, Q., Magee, T. R. A., Healy, M., & Lizardi-Mendoza, J. (2007). Modification of chitin properties for enzymatic deacetylation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(2), 165-173.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., & Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80
- Bégin, A., & Van Calsteren, M.-R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63-67.
- Benner, R., Miget, R., Finne, G., & Acuff, G. (1994). Lactic acid/melanosis inhibitors to improve shelf life of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Journal of food science*, 59(2), 242-245.
- Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatmula, W., & No, H. K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25(3), 534-537.
- Bhat, R., Abdullah, N., Din, R. H., & Tay, G. S. (2013). Producing novel sago starch based food packaging films by incorporating lignin isolated from oil palm black liquor waste. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 707-713.
- Bhattacharyya, A., Bhaumik, A., Rani, P. U., Mandal, S., & Eidi, T. T. (2010). Nano-particles-A recent approach to insect pest control. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3489-3493.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., & Kishimura, H. (2008). Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106(1), 185-193.
- Bishop, C. D. (1995). Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden amp; Betche) Cheel (Tea Tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*, 7(6), 641-644.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, M. P. (2013). Effect of different protein extracts from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 118-131.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, P. (2013). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. *LWT - Food Science and Technology*(0).
- Blanco-Pascual, N., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37, 100-110.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A., Lemaire, J., Sancelme, M., & Scott, G. (2003). Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81(3), 441-452.
- Bordes, P., Pollet, E., & Avérous, L. (2009). Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. *Progress in Polymer Science*, 34, 125-155.
- Bouajila, J., Dole, P., Joly, C., & Limare, A. (2006). Some laws of a lignin plasticization. *Journal of applied polymer science*, 102(2), 1445-1451.
- Boudet, A.-M. (2000). Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 81-96.
- Brandenburg, A., Weller, C., & Testin, R. (1993). Edible films and coatings from soy protein. *Journal of food science*, 58(5), 1086-1089.

- Brine, C. J., & Austin, P. R. (1981). Chitin variability with species and method of preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 69(2), 283-286.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2004). *Carotenoids: handbook*: Springer.
- Brody, A. L., Strupinsky, E., & Kline, L. R. (2010). *Active packaging for food applications* (Vol. 6): CRC press.
- Brother, G. H., & McKinney, L. L. (1940). Protein Plastics from Soybean Products. *Industrial & Engineering Chemistry*, 32(7), 1002-1006.
- Brown, M., & Hebert, A. A. (1997). Insect repellents: An overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 36(2), 243-249.
- Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N., & Sánchez-Machado, D. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112(3), 671-675.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833-848.
- Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho Jr, L. B., Nader, H. B., & Bezerra, R. S. (2012). Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47(4), 570-577.
- Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., & Kennedy, J. F. (2006). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 211-217.
- Cai, L., & Wu, C. D. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, 59(10), 987-990.
- Camero, M. I., Jaramillo, C. J., Ordoñez, J. A., Cobos, A., Pereira-Lima, C. I., & de Fernando, G. D. G. (1998). Effect of cooking conditions on the flavour compounds and composition of shrimp (*Parapenaeus longirostris*) broth. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 206(5), 311-322.
- Campos-Vallette, M. M., Chandía, N. P., Clavijo, E., Leal, D., Matsuhira, B., Osorio-Román, I. O., & Torres, S. (2010). Characterization of sodium alginate and its block fractions by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(7), 758-763.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875.
- Cancre, I., Ravallec, R., Van Wormhoudt, A., Stenberg, E., Gildberg, A., & Le Gal, Y. (1999). Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Marine Biotechnology*, 1(5), 489-494.
- Casettari, L., Gennari, L., Angelino, D., Ninfali, P., & Castagnino, E. (2012). ORAC of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 243-247.
- Cazacu, G., Pascu, M., Profire, L., & Vasile, C. (2002). Environmental friendly polymer materials. I. Polyolefins-lignin based materials. *Environ. Prot. Ecol.*, 3(1), 242-248.
- Cazacu, G., Pascu, M. C., Profire, L., Kowarski, A., Mihaes, M., & Vasile, C. (2004). Lignin role in a complex polyolefin blend. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 261-273.
- Cervera, M., Heinämäki, J., Paz, N., López, O., Maunu, S., Virtanen, T., Hatanpää, T., Antikainen, O., Nogueira, A., Fundora, J., & Yliruusi, J. (2011). Effects of Spray Drying on Physicochemical Properties of Chitosan Acid Salts. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 637-649.
- Cetin, N. S., & Özmen, N. (2002). Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production: I. Organosolv lignin modified resins. *International journal of adhesion and adhesives*, 22(6), 477-480.

- Cohen, E. (2010). Chapter 2 - Chitin Biochemistry: Synthesis, Hydrolysis and Inhibition. In C. Jérôme & J. S. Stephen (Eds.), *Advances in Insect Physiology* (Vol. Volume 38, pp. 5-74): Academic Press.
- Coles, R., McDowell, D., & Kirwan, M. J. (2003). *Food packaging technology*: Blackwell Oxford.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat science*, 78(1), 90-103.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of food science*, 67(3), 1162-1169.
- Conte, A., Angiolillo, L., Mastromatteo, M., & Nobile, M. A. D. (2013). *Technological Options of Packaging to Control Food Quality*. In Innocenzo Muzzalupo (Ed.), Food Industry. Chapter 16.
- Coral-Hinostroza, G. N., & Bjerkeng, B. (2002). Astaxanthin from the red crab langostilla *Pleuroncodes planipes*: optical R/S isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(3), 437-444.
- Coward-Kelly, G., Agbogbo, F. K., & Holtzapple, M. T. (2006). Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. *Bioresource Technology*, 97(13), 1515-1520.
- Chang, M. C., & Tanaka, J. (2002). FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*, 23(24), 4811-4818.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., & Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of ethnopharmacology*, 77(1), 123-127.
- Chao, L. K., Hua, K.-F., Hsu, H.-Y., Cheng, S.-S., Liu, J.-Y., & Chang, S.-T. (2005). Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7274-7278.
- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639-649.
- Chattopadhyay, D., & Inamdar, M. S. (2011). Aqueous behaviour of chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 2010.
- Chebotok, E. N., Novikov, V. Y., & Konovalova, I. N. (2006). Depolymerization of chitin and chitosan in the course of base deacetylation. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 79(7), 1162-1166.
- Chen, C. R., & Ramaswamy, H. S. (2002). Color and Texture Change Kinetics in Ripening Bananas. *LWT - Food Science and Technology*, 35(5), 415-419.
- Chen, P.-Y., Lin, A. Y.-M., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2008). Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. *Acta biomaterialia*, 4(3), 587-596.
- Cheng, L. H., Karim, A. A., & Seow, C. C. (2006). Effects of Water-Glycerol and Water-Sorbitol Interactions on the Physical Properties of Konjac Glucomannan Films. *Journal of food science*, 71(2), E62-E67.
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39-47.
- Cheung, I. (2007). *Bitterness in enzymatically-produced hydrolysates of commercial shrimp (Pandalopsis dispar) processing waste*. Master Dissertation. The University of British Columbia, Canada.
- Cheung, L. K., Cheung, I. W., & Li-Chan, E. C. (2012). Effects of production factors and egg-bearing period on the antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6823-6831.
- Chick, J., & Ustunol, Z. (1998). Mechanical and Barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films. *Journal of food science*, 63(6), 1024-1027.
- Cho, S. Y., Lee, S. Y., & Rhee, C. (2010). Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 43(8), 1234-1239.
- Chung, Y.-C., & Chen, C.-Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99(8), 2806-2814.

- d'Áyala, G. G., Malinconico, M., & Laurienzo, P. (2008). Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*, 13(9), 2069-2106.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dalev, P. G., Patil, R. D., Mark, J. E., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. *Journal of applied polymer science*, 78(7), 1341-1347.
- Daouk, R. K., Dagher, S. M., & Sattout, E. J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58(10), 1147-1149.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981-1014.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- De Holanda, H. D., & Netto, F. M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of food science*, 71(5), C298-C303.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science*, 38(4), 299-313.
- Debeaufort, F., Voilley, A., & Luu, D. (2009). Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 548-558.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714.
- Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983-5990.
- Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkane, V., & Viesturs, U. (2004). Characterization of the radical scavenging activity of lignins—natural antioxidants. *Bioresource Technology*, 95(3), 309-317.
- Doi, E. (1993). *Food hydrocolloids: structures, properties, and functions*: Springer.
- Domard, A., & Rinaudo, M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(1), 49-52.
- Dong, Y., Xu, C., Wang, J., Wang, M., Wu, Y., & Ruan, Y. (2001). Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China Series B: Chemistry*, 44(216-224).
- Dornier, M., Lallemand, H., Pirot, N., & Reynes, M. (2000). Cinnamon: history, production and principal characteristics. *Fruits*, 55(6), 421-432.
- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from algae. *Biopolymers Online*.
- Duan, B., Yuan, X., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, X., Zhang, Y., & Yao, K. (2006). A nanofibrous composite membrane of PLGA–chitosan/PVA prepared by electrospinning. *European Polymer Journal*, 42(9), 2013-2022.
- Dung, P. I., Milas, M., Rinaudo, M., & Desbrières, J. (1994). Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 24(3), 209-214.
- Dürr, U. H., Sudheendra, U., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1408-1425.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Edrisi Sormoli, M., Imtiaz Ul Islam, M., & Langrish, T. A. G. (2012). The effect of chitosan hydrogen bonding on lactose crystallinity during spray drying. *Journal of Food Engineering*, 108(4), 541-548.

- Eiselt, P., Yeh, J., Latvala, R. K., Shea, L. D., & Mooney, D. J. (2000). Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, 21(19), 1921-1927.
- El-Baroty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S., & Saleh, M. A. (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African journal of Biochemistry Research*, 4(6), 167-174.
- El-Hefian, E. A., Elgannoudi, E. S., Mainal, A., & Yahaya, A. H. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 47-56.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*: Springer.
- Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325-337.
- Epure, V., Griffon, M., Pollet, E., & Avérous, L. (2011). Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 947-952.
- Er, Y., Liu, D., Patane, M., Dehghani, F., & Gomes, V. (2011). Structure, thermal stability and content assay of hemocyanin from molluscs. *Chemeca 2011: Engineering a Better World: Sydney Hilton Hotel, NSW, Australia, 18-21 September 2011*, 1485
- Fabritius, H., Sachs, C., Raabe, D., Nikolov, S., Friák, M., & Neugebauer, J. (2011). Chitin in the exoskeletons of arthropoda: From ancient design to novel materials science. In *Chitin* (pp. 35-60): Springer.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303.
- Fallik, E., Temkin-Gorodeiski, N., Grinberg, S., & Davidson, H. (1995). Prolonged low-temperature storage of eggplants in polyethylene bags. *Postharvest Biology and Technology*, 5(1-2), 83-89.
- FAO. (1997). FAO Agriculture Series. In *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. <http://www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s00.HTM> [Consulta: lunes, 18 de noviembre de 2013]
- FAO. (2001). Los mercados mundiales de frutas y verduras orgánicas. In: FAO. <http://www.fao.org/docrep/004/y1669s/y1669s00.htm> [Consulta: lunes, 18 de noviembre de 2013]
- FAO. (2004). El estado mundial de la pesca y la acuicultura In: FAO. <http://www.fao.org/docrep/007/y5600s/y5600s00.HTM> [Consulta: lunes, 18 de noviembre de 2013]
- FAO. (2012). FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. In: FAO. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en> [Consulta: lunes, 18 de noviembre de 2013]
- Ifei, L., Yuting, D., Xingqian, Y., & Donghong, L. (2010). Cinnamon and nisin in alginate-calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1331-1335.
- Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., & Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126-132.
- Feng, Y., Han, Z., Peng, J., Lu, J., Xue, B., Li, L., Ma, H., & Wang, E. (2006). Fabrication and characterization of multilayer films based on Keggin-type polyoxometalate and chitosan. *Materials Letters*, 60(13-14), 1588-1593.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2010). Antibacterial chitosan-based blends with ethylene-vinyl alcohol copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 874-884.

- Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J., & Ocio, M. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control. Control*, 34(1), 61-68.
- Fernandez-Saiz, P., Soler, C., Lagaron, J., & Ocio, M. (2010). Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. *International journal of food microbiology*, 137(2), 287-294.
- Ferreira, C. O., Nunes, C. A., Delgadillo, I., & Lopes-da-Silva, J. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807-813.
- Findlay, J. B. C., Pappin, D. J. C., Brett, M., & Zagalsky, P. F. (1989). Carotenoproteins. In N. Krinsky, M. Mathews-Roth & R. Taylor (Eds.), *Carotenoids* (pp. 75-104): Springer US.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 25-28.
- Focher, B., Beltrame, P. L., Naggi, A., & Torri, G. (1990). Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. *Carbohydrate Polymers*, 12(4), 405-418.
- Fradin, M. S. (1998). Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. *Annals of Internal Medicine*, 128(11), 931-940.
- Fradin, M. S., & Day, J. F. (2002). Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England Journal of Medicine*, 347(1), 13-18.
- Francis Suh, J.-K., & Matthew, H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), 2589-2598.
- Freile-Pelegrín, Y., Madera-Santana, T., Robledo, D., Veleza, L., Quintana, P., & Azamar, J. A. (2007). Degradation of agar films in a humid tropical climate: Thermal, mechanical, morphological and structural changes. *Polymer Degradation and Stability*, 92(2), 244-252.
- Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737-1761.
- Fukushima, D. (1981). Soy proteins for foods centering around soy sauce and tofu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3), 346-354.
- Furda, I. (1983). Aminopolysaccharides—their potential as dietary fiber. *Unconventional sources of dietary fiber*. Washington, DC: ACS, 105-122.
- Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydrate Polymers*, 8(3), 161-182.
- Gagne, N., & Simpson, B. (1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology*, 7(3), 253-263.
- Gao, X. D., Katsumoto, T., & Onodera, K. (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J Biochem*, 117(2), 257-263.
- Gardner, D. J., Generalla, N. C., Gunnells, D. W., & Wolcott, M. P. (1991). Dynamic wettability of wood. *Langmuir*, 7(11), 2498-2502.
- Gennadios, A., Weller, C., & Testin, R. (1993). Temperature Effect on Oxygen Permeability of Edible Protein-based Films. *Journal of food science*, 58(1), 212-214.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science*, 76(1), 172-181.
- Geraldine, R. M., Soares, N. d. F. F., Botrel, D. A., & de Almeida Gonçalves, L. (2008). Characterization and effect of edible coatings on minimally processed garlic quality. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 403-409.

- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127(4), 1496-1502.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 809-812.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International journal of food microbiology*, 108(1), 1-9.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 170-174.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750-5755.
- Gill, P., Moghadam, T., & Ranjbar, B. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21(4), 167-193.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 264-271.
- Glicksman, M. (1987). Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. In M. Ragan & C. Bird (Eds.), *Twelfth International Seaweed Symposium* (Vol. 41, pp. 31-47): Springer Netherlands.
- Godefroot, M., Sandra, P., & Verzele, M. (1981). New method for quantitative essential oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 203(0), 325-335.
- Gombotz, W. R., & Wee, S. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31(3), 267-285.
- Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M., Alemán, A., & Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1), 18-25.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78-85.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1133-1143.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 20(1), 3-16.
- Gonçalves, A. C., López-Caballero, M. E., & Nunes, M. L. (2003). Quality Changes of Deepwater Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Packed in Modified Atmosphere. *Journal of food science*, 68(8), 2586-2590.

- Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.
- González, A., Strumia, M. C., & Alvarez Igarzabal, C. I. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering*, 106(4), 331-338.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195-198.
- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1), 345-351.
- Guenther, E., & Althausen, D. (1952). *The essential oils* (Vol. 6): Van Nostrand New York.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A., & Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42(11), 1486-1491.
- Guibal, E., Touraud, E., & Roussy, J. (2005). Chitosan Interactions with Metal Ions and Dyes: Dissolved-state vs. Solid-state Application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7), 913-920.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
- Guo, M., Jin, T. Z., Yang, R., Antenucci, R., Mills, B., Cassidy, J., Scullen, O. J., Sites, J. E., Rajkowski, K. T., & Sommers, C. H. (2013). Inactivation of natural microflora and inoculated *Listeria innocua* on whole raw shrimp by ozonated water, antimicrobial coatings, and cryogenic freezing. *Food Control*, 34(1), 24-30.
- Gupta, K. C., & Jabrail, F. H. (2006). Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 43-54.
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Hammer, K. A., Carson, C., & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- Han, C., Lederer, C., McDaniel, M., & Zhao, Y. (2005). Sensory Evaluation of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*) Coated with Chitosan-based Edible Coatings. *Journal of food science*, 70(3), S172-S178.
- Han, J., & Gennadios, A. (2005). Edible films and coatings: a review. *Innovations in food packaging*, 239, 262.
- Hao, Y., Brackett, R., & Doyle, M. (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiology*, 15(4), 367-378.
- Hawtin, G. (2007). Underutilized Plant Species Research and Development Activities – Review of issues and options In: FAO.
- Hayashi, Y., Ohara, N., Ganno, T., Ishizaki, H., & Yanagiguchi, K. (2007). Chitosan-containing gum chewing accelerates antibacterial effect with an increase in salivary secretion. *Journal of dentistry*, 35(11), 871-874.
- He, H., Chen, X., Sun, C., Zhang, Y., & Gao, P. (2006). Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology*, 97(3), 385-390.

- Hejazi, R., & Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 89(2), 151-165.
- Helander, I. M., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71(2-3), 235-244.
- Hernandez-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation—A Review. *Journal of food science*, 73(2), R30-R39.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F., & Argüelles-Monal, W. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 41-45.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
- Hosseini, M. H., Razavi, S. H., & Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 727-743.
- Hsieh, W.-C., Chang, C.-P., & Gao, Y.-L. (2006). Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2), 209-214.
- Huang, J., Chen, Q., Qiu, M., & Li, S. (2012). Chitosan-based edible coatings for quality preservation of postharvest whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of food science*, 77(4), 6.
- Huang, Y., Ho, S.-H., Lee, H.-C., & Yap, Y.-L. (2002). Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(5), 403-412.
- Hunt, R., Sellers, V., Frankalin, W., Nelson, J., Rathje, W., Hughes, W., & Wilson, D. (1990). Estimates of the volume of MSW and selected components in trash cans and land fills. *Tucson, Ariz.: Report prepared by The Garbage Project and Franklins Assn. Ltd. for the Council for Solid Waste Solutions*.
- Hwang, K. T., Jung, S. T., Lee, G. D., Chinnan, M. S., Park, Y. S., & Park, H. J. (2002). Controlling Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan by Response Surface Methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 1876-1882.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Handa, K., Nakatsubo, F., & Yano, H. (2007). Surface Modification of Bacterial Cellulose Nanofibers for Property Enhancement of Optically Transparent Composites: Dependence on Acetyl-Group DS. *Biomacromolecules*, 8(6), 1973-1978.
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- INTIA. (2011). Mosca de la fruta, mosca mediterránea (*Ceratitis capitata*). In (Vol. 2013). Navarra. <http://www.itga.com/estacion/index.asp?IdPlagaComun=31&IdPlagaCientifico=0&IdCultivo=0> [Consulta: viernes, 25 de octubre de 2013]
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8), 603-608.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 45-66.

- Janssen, A., Scheffer, J., & Svendsen, A. B. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta medica*, 53(05), 395-398.
- Jeon, Y.-J., Kamil, J. Y., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(18), 5167-5178.
- Jeon, Y.-J., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71-76.
- Jia, D., Fang, Y., & Yao, K. (2009). Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan–chitosan–soy protein isolate edible films. *Food and Bioproducts Processing*, 87(1), 7-10.
- Jiang, Y., & Li, Y. (2001). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73(2), 139-143.
- Julinová, M., Kupec, J., Alexy, P., Hoffmann, J., Sedlařík, V., Vojtek, T., Chromčáková, J., & Bugaj, P. (2010). Lignin and starch as potential inductors for biodegradation of films based on poly(vinyl alcohol) and protein hydrolysate. *Polymer Degradation and Stability*, 95(2), 225-233.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A., & Bouriotes, V. (1993). Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 2564-2568.
- Katz, T. M., Miller, J. H., & Hebert, A. A. (2008). Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(5), 865-871.
- Kauss, H., Jeblick, W., & Young, D. H. (1983). Chitin Deacetylase from the Plant Pathogen *Colletotrichum Lindemuthianum*. *Plant Science Letters*, 28.
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., & Tadini, C. C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1088-1094.
- Kendra, D. F., & Hadwiger, L. A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, 8(3), 276-281.
- Kester, J., & Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology*, 40.
- Khan, M., & Nowsad, A. (2013). Development of protein enriched shrimp crackers from shrimp shell wastes. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 10(2), 367-374.
- Khan, T., Peh, K., & Ch'ng, H. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5, 205-212.
- Kim, D., Baek, H., Ahn, C., Byun, D., Jung, K., Lee, H., Cadwallader, K., & Kim, H. (2000). Development and characterization of a flavoring agent from oyster cooker effluent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), 4839-4843.
- Kim, E.-H., Kim, H.-K., & Ahn, Y.-J. (2003). Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 885-889.
- Kim, J.-K., Kang, C.-S., Lee, J.-K., Kim, Y.-R., Han, H.-Y., & Yun, H. K. (2005). Evaluation of Repellency Effect of Two Natural Aroma Mosquito Repellent Compounds, Citronella and Citronellal*. *Entomological Research*, 35(2), 117-120.
- Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S.-K., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2006). Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. *Journal of food science*, 71(3), E119-E124.
- Kim, K. W., Min, B., Kim, Y.-T., Kimmel, R. M., Cooksey, K., & Park, S. (2011). Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 565-569.
- Kim, K. W., & Thomas, R. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101(1), 308-313.

- Kim, S.-K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*, 39(4), 383-393.
- Kim, S.-K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357-368.
- King, A. (1983). Brown seaweed extracts (alginates). *Food Hydrocolloids*, 2, 115-188.
- Kittikaiwan, P., Powthongsook, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. *Carbohydrate Polymers*, 70(4), 378-385.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
- Knorr, D. (1982). Functional properties of chitin and chitosan. *Journal of food science*, 47(2), 593-595.
- Kofuji, K., Qian, C.-J., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y., & Kawashima, S. (2005). Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal*, 41(11), 2784-2791.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- Kosseva, M. R. (2009). Chapter 3 Processing of Food Wastes. In L. T. Steve (Ed.), *Advances in food and nutrition research* (Vol. Volume 58, pp. 57-136): Academic Press.
- Kramer, R. E. (1985). Antioxidants in clove. *Journal of American Oil Chemists`Society*, 62, 111-113.
- Kristal, A. R. (2004). Vitamin A, retinoids and carotenoids as chemopreventive agents for prostate cancer. *The Journal of urology*, 171(2), S54-S58.
- Kumirska, J., Weinhold, M. X., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2011). Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*, 3(4), 1875-1901.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *Journal of food science*, 76(9), R164-R177.
- Kweon, H., Ha, H. C., Um, I. C., & Park, Y. H. (2001). Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. *Journal of applied polymer science*, 80(7), 928-934.
- Kyrikou, I., & Briassoulis, D. (2007). Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. *Journal of Polymers and the Environment*, 15(2), 125-150.
- Lahlou, M., & Berrada, R. (2003). Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. *Flavour and fragrance journal*, 18(2), 124-127.
- Lakshman, M., & Okoh, C. (1993). [8] Carotenoid-protein complexes. *Methods in enzymology*, 214, 74-86.
- Lalaleo, L. (2010). *Desarrollo de un método para la obtención de quitosano a partir de caparzones de camarón (Penaeus vannamei) utilizando un agente reductor químico*. Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. 100 p.
- Lambert, R., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8), 2533-2541.
- Leach, A. W., & Mumford, J. D. (2008). Pesticide Environmental Accounting: A method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental Pollution*, 151(1), 139-147.

- LeBlanc, R. J., & Gill, T. A. (1984). Ammonia as an Objective Quality Index in Squid. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17(4), 195-201.
- Leceta, I., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 339-346.
- Lee, H.-W., Park, Y.-S., Jung, J.-S., & Shin, W.-S. (2002). Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe*, 8(6), 319-324.
- Lee, J.-P., Lee, K.-H., & Song, H.-K. (1997). Manufacture of biodegradable packaging foams from agar by freeze-drying. *Journal of materials science*, 32(21), 5825-5832.
- Lee, J. K., Kim, S. U., & Kim, J. H. (1999). Modification of chitosan to improve its hypocholesterolemic capacity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(5), 833-839.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
- Letendre, M., D'aprano, G., Lacroix, M., Salmieri, S., & St-Gelais, D. (2002). Physicochemical properties and bacterial resistance of biodegradable milk protein films containing agar and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6017-6022.
- Li, J., & Chen, H. (2000). Biodegradation of Whey Protein-Based Edible Films. *Journal of Polymers and the Environment*, 8(3), 135-143.
- Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, 138(2–3), 821-826.
- Li, Y.-Q. (2012). Structure Changes of Soybean Protein Isolates by Pulsed Electric Fields. *Physics Procedia*, 33(0), 132-137.
- Li, Y.-q., Kong, D.-x., & Wu, H. (2013). Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 41(0), 269-278.
- Licciardello, F., Muratore, G., Suma, P., Russo, A., & Nerín, C. (2013). Effectiveness of a novel insect-repellent food packaging incorporating essential oils against the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19(0), 173-180.
- Lin, C., Yu, C., Wu, S., & Yih, K. (2009). DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17(5), 386-395.
- Liñán-Cabello, M., Paniagua-Michel, J., & Hopkins, P. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 8(4), 299-309.
- Liu, M., Zhou, Y., Zhang, Y., Yu, C., & Cao, S. (2013). Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. *Food Hydrocolloids*.
- Liu, N., Chen, X.-G., Park, H.-J., Liu, C.-G., Liu, C.-S., Meng, X.-H., & Yu, L.-J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 60-65.
- Lodha, P., & Netravali, A. N. (2005). Effect of soy protein isolate resin modifications on their biodegradation in a compost medium. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 465-477.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- López-Caballero, M., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International journal of food science & technology*, 42(9), 1029-1038.
- López-Caballero, M., Martínez-Álvarez, O., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2006). Effect of natural compounds alternative to commercial antimelanotics on polyphenol oxidase activity and

- microbial growth in cultured prawns (*Marsupenaeus tiger*) during chilled storage. *European Food Research and Technology*, 223(1), 7-15.
- López-Caballero, M., Sánchez-Fernández, J., & Moral, A. (2001). Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained under different CO₂ and O₂ concentrations. *International journal of food microbiology*, 64(3), 277-287.
- López-Caballero, M. E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2013). Valorization and Integral Use of Seafood By-Products. In *Engineering Aspects of Food Biotechnology* (pp. 367-412): CRC Press.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005a). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., Pérez-Mateos, M., & Montero, E. (2005b). A Functional Chitosan-Enriched Fish Sausage Treated by High Pressure. *Journal of food science*, 70(3), M166-M171.
- López-Caballero, M., Gonçalves, A., & Nunes, M. (2002). Effect of CO₂/O₂-containing modified atmospheres on packed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *European Food Research and Technology*, 214(3), 192-197.
- López-de-Dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2011). Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering*, 104(3), 380-386.
- López-de-Dicastillo, C., Nerín, C., Alfaro, A., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7832-7840.
- López de Lacey, A., López-Caballero, M., & Montero, P. (2013). Agar Films Containing Green Tea Extract And Probiotic Bacteria For Extending Fish Shelf-Life. *LWT-Food Science and Technology*.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., & Nerin, C. (2005). Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939-6946.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348-4356.
- Lora, J. H., & Glasser, W. G. (2002). Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, 10(1-2), 39-48.
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X., & Liu, D. (2010). Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1331-1335.
- Lu, F., Liu, D., Ye, X., Wei, Y., & Liu, F. (2009). Alginate–calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 °C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 848-854.
- Lu, F. J., Chu, L. H., & Gau, R. J. (1998). Free radical-scavenging properties of lignin.
- Lubarsky, G. V., Davidson, M. R., & Bradley, R. H. (2007). Hydration–dehydration of adsorbed protein films studied by AFM and QCM-D. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1275-1281.
- Magnin, D., Lefebvre, J., Chornet, E., & Dumitriu, S. (2004). Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*, 55(4), 437-453.
- Mahmoud, N., Ghaly, A. E., & Arab, F. (2007). Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3(1), 1.

- Mahmoud, B., Yamazaki, K., Miyashita, K., Il-Shik, S., Dong-Suk, C., and Suzuki, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21(6), 657-666.
- Maji, T. K., Baruah, I., Dube, S., & Hussain, M. R. (2007). Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology*, 98(4), 840-844.
- Mancini-Filho, J., Van-Koij, A., Mancini, D., Cozzolino, F., & Torres, R. (1998). Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, Breyne) extracts. *Bollettino chimico farmaceutico*, 137(11), 443.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Marquié, C. (2001). Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4676-4681.
- Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food packaging—roles, materials, and environmental issues. *Journal of food science*, 72(3), R39-R55.
- Martínez-Álvarez, O., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2005). A 4-Hexylresorcinol-based Formulation to Prevent Melanosis and Microbial Growth in Chilled Tiger Prawns (*Marsupenaeus japonicus*) from Aquaculture. *Journal of food science*, 70(9), M415-M422.
- Martinou, A., Bouriotis, V., Stokke, B., & Vårum, K. (1998). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-acetylated chitosans. *Carbohydrate Research*, 311.
- Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (1995). Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Research*, 273(2), 235-242.
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 94(8), 1307-1313.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International journal of food microbiology*, 107(2), 180-185.
- Matsuno, T., & Hirao, S. (1989). Marine carotenoids. *Marine biogenic lipids, fats, and oils*, 1, 251-388.
- Mauri, A., & Añón, M. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14(2), 119-125.
- Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47(3), 195-203.
- Mayes, S., Massawe, F. J., Alderson, P. G., Roberts, J. A., Azam-Ali, S. N., & Hermann, M. (2011). The potential for underutilized crops to improve security of food production. *Journal of Experimental Botany*.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, S. (1991). Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food technology*(September), 80-86.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32(3), 253-273.
- McLachlan, J. (1985). Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. *Plant and Soil*, 89(1-3), 137-157.
- McWatters, K. H., & Cherry, J. P. (1977). Emulsification, foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, field pea and pecan flours. *Journal of food science*, 42(6), 1444-1447.

- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31.
- Mendes, M. F., Pessoa, F. L., Hui, Y., Chen, F., Nollet, L., Guiné, R., Martín-Belloso, O., Mínguez-Mosquera, M., Paliyath, G., & Quéré, J. L. (2010). Spices, Seasonings, and Essential Oils. *Handbook of fruit and vegetable flavors*, 1023.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R. L., Maraschin, M., & Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), 1383-1391.
- Mikulášová, M., Košíková, B., Alexy, P., Kačík, F., & Urgelová, E. (2001). Effect of blending lignin biopolymer on the biodegradability of polyolefin plastics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(6), 601-607.
- Milicua, J. G., Gomez, R., Gárate, A. M., & Macarulla, J. (1985). A red carotenoprotein from the carapace of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 81(4), 1023-1025.
- Militante, J. D., & Lombardini, J. B. (2002). Taurine: evidence of physiological function in the retina. *Nutritional neuroscience*, 5(2), 75.
- Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 228-237.
- Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., & Imanishi, J. (2003). The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiology and immunology*, 47(9), 681.
- Ming Larng, T., & Rong, H. C. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of applied polymer science*, 88.
- Mishra, S. B., Mishra, A., Kaushik, N., & Khan, M. A. (2007). Study of performance properties of lignin-based polyblends with polyvinyl chloride. *Journal of materials processing technology*, 183(2), 273-276.
- Mitchell, W., & Saul, S. (1990). Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, and their application in the USA. *Review of Agricultural Entomology*, 78(9), 923-930.
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S., & Mima, S. (1980). Ir spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(5), 323-324.
- Mizani, M., Aminlari, M., & Khodabandeh, M. (2005). An effective method for producing a nutritive protein extract powder from shrimp-head waste. *Food Science and Technology International*, 11(1), 49-54.
- Mohanty, N. K., Saxena, S., Singh, U. P., Goyal, N. K., & Arora, R. P. (2005). Lycopene as a chemopreventive agent in the treatment of high-grade prostate intraepithelial neoplasia. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 23, pp. 383-385): Elsevier.
- MolecularRecipes. (2013). Clear Canapé & Disappearing Transparent Ravioli. In. <http://www.molecularrecipes.com/techniques/disappearing-transparent-raviolis/> [Consulta: viernes, 03 de enero de 2014]
- Monedero, F. M., Hambleton, A., Talens, P., Debeaufort, F., Chiralt, A., & Voilley, A. (2010). Study of the retention and release of n-hexanal incorporated into soy protein isolate–lipid composite films. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 133-138.

- Moon, T., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. (2006). Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis and Hexamita inflata. *Parasitology research*, 99(6), 722-728.
- Moore, G. K., & Roberts, G. A. F. (1980). Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2(2), 115-116.
- Moraes, R., Elfvendahl, S., Kylin, H., & Molander, S. (2003). Pesticide residues in rivers of a Brazilian rain forest reserve: Assessing potential concern for effects on aquatic life and human health. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 32(4), 258-263.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42(1), 67-89.
- Moss, G., & Weedon, B. (1976). Chemistry of the carotenoids. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, 1, 149-224.
- Mousavioun, P., George, G. A., & Doherty, W. O. S. (2012). Environmental degradation of lignin/poly(hydroxybutyrate) blends. *Polymer Degradation and Stability*, 97(7), 1114-1122.
- Mulching. www.agrojoliwordpress.com. [Consulta: sabado, 04 de enero de 2014]
- Müller, G. C., Junnila, A., Kravchenko, V. D., Revay, E. E., Butler, J., & Schlein, Y. (2008). Indoor Protection Against Mosquito and Sand Fly Bites: A Comparison Between Citronella, Linalool, and Geraniol Candles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(1), 150-153.
- Murcia, M. A., Egea, I., Romojaro, F., Parras, P., Jiménez, A. M., & Martínez-Tomé, M. (2004). Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1872-1881.
- Muzzarelli, R. A., & Peter, M. G. (1997). *Chitin handbook*: Atec.
- Nakahara, K., Alzoreky, N. S., Yoshihashi, T., Nguyen, H. T., & Trakoontivakorn, G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Cymbopogon nardus (citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37(4), 249-252.
- Nanasombat S., & Wiumuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024.
- Ncube, N., Afolayan, A., & Okoh, A. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana. *Crop protection*, 26(4), 697-705.
- Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M., & Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 521-526.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372-378.
- Nessa, F., Masum, S. M., Asaduzzaman, M., Roy, S., Hossain, M., & Jahan, M. (2010). A process for the preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(4), 323-330.
- Nieto, M. B. (2009). Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. In *Edible films and coatings for food applications* (pp. 57-112): Springer.
- Nikolov, S., Petrov, M., Lymperakis, L., Friák, M., Sachs, C., Fabritius, H.-O., Raabe, D., & Neugebauer, J. (2010). Revealing the Design Principles of High-Performance Biological Composites Using Ab

- initio and Multiscale Simulations: The Example of Lobster Cuticle. *Advanced Materials*, 22(4), 519-526.
- Nirmal, N., & Benjakul, S. (2009). Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(9), 3578-3586.
- Nirmal, N. P., & Benjakul, S. (2011). Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. *International journal of food microbiology*, 149(3), 247-253
- No, H., Meyers, S., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of food science*, 72(5), R87-R100.
- No, H. K., & Meyers, S. P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan—a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 27-52.
- No, H. K., Meyers, S. P., & Lee, K. S. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 575-579.
- No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74(1–2), 65-72.
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2012). Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 60-71.
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 163-172.
- Nussinovitch, A. (2009). CHAPTER 10 - Biopolymer Films and Composite Coatings. In K. Stefan, T. N. Ian, I. T. N. Johan B. UbbinkA2 - Stefan Kasapis & B. U. Johan (Eds.), *Modern Biopolymer Science* (pp. 295-326). San Diego: Academic Press.
- Nuthong, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2009). Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 736-741.
- Nyström, B., Kjøniksen, A.-L., & Iversen, C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(2–3), 81-103.
- Oh, Y.-S., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., & Wang, S.-L. (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1–2), 3-10.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193-198.
- Ojagh, S. M., Sahari, M., Rezaei, M., & Hosseini, S. V. (2011). Applicability of β -carotene and green tea polyphenols as two natural antioxidants in preservation of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) with ice. *Int. J. Agric.: Res. Rev*, 1, 174-181.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2003). Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 337-342.
- Olivas, G., & Barbosa-Cánovas, G. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(7-8), 657-670.
- Oliveira Cavaleiro, J. M., Oliveira de Souza, E., & Bora, P. S. (2007). Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. *Bioresource Technology*, 98(3), 602-606.

- Osborne, T. B., Mendel, L. B., Ferry, W. E. L., & Wakeman, A. J. (1917). THE USE OF SOY BEAN AS FOOD. *Journal of Biological Chemistry*, 32(3), 369-387.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., & Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International journal of food microbiology*, 62(1), 139-148.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006a). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244.
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006b). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*®, 69(5), 1046-1055.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5598-5605.
- Padgett, T., Han, I., & Dawson, P. (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*®, 61(10), 1330-1335.
- Paiva, A. P., Barcelos, M. d. F. P., Pereira, J. d. A. R., Ferreira, E. B., & Ciabotti, S. (2012). Characterization of food bars manufactured with agroindustrial by-products and waste. *Ciência e Agrotecnologia*, 36(3), 333-340.
- Park, B. K., & Kim, M.-M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International journal of molecular sciences*, 11(12), 5152-5164.
- Park, H. J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 10(8), 254-260.
- Park, I.-K., & Shin, S.-C. (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4388-4392.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Byun, H.-G., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2004). Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of microbiology and biotechnology*, 14(2), 317-323.
- Park, S.-i., & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933-1939.
- Park, S., Bae, D., & Rhee, K. (2000). Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(8), 879-884.
- Park, S. Y., Marsh, K. S., & Rhim, J. W. (2002). Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. *Journal of food science*, 67(1), 194-197.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., & Etcheverry, M. (2013). Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 434-444.
- Passone, M. A., Girardi, N. S., Ferrand, C. A., & Etcheverry, M. (2012). Invitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70(0), 82-88.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Cháfer, M., & González-Martínez, C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 272-280.

- Pastor, C., Vargas, M., & González-Martínez, C. (2005). Recubrimientos comestibles: aplicación a frutas y hortalizas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 24(197), 130-135.
- Patil, R., Mark, J., Apostolov, A., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *European Polymer Journal*, 36(5), 1055-1061.
- Patil, R. D., Dalev, P. G., Mark, J. E., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters. *Journal of applied polymer science*, 76(1), 29-37.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., & Kole, C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, 86(349), 237-246.
- Pavlath, A. E., Voisin, A., & Robertson, G. H. (1999). Pectin-based biodegradable water insoluble films. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 140, pp. 107-113): Wiley Online Library.
- Pavlath, A. E., Gosset, C., Camirand, W., & Robertson, G. H. (1999). Ionomeric films of alginic acid. *Journal of Food Science*, 64, 61-63.
- Pearson, F. G., Marchessault, R. H., & Liang, C. Y. (1960). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. *Journal of Polymer Science*, 43(141), 101-116.
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1372-1381.
- Pereira, A., Martins, G., Antunes, P., Conrrado, R., Pasquini, D., Job, A., Curvelo, A., Ferreira, M., Riul, A., & Constantino, C. (2007). Lignin from sugar cane bagasse: extraction, fabrication of nanostructured films, and application. *Langmuir*, 23(12), 6652-6659.
- Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 53-61.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 87-94.
- Petersen, K., Væggemose Nielsen, P., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H., & Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10(2), 52-68.
- Petrov, M., Lymperakis, L., Friák, M., & Neugebauer, J. (2013). Ab Initio Based conformational study of the crystalline α -chitin. *Biopolymers*, 99(1), 22-34.
- Phan, T. D., Debeaufort, F., Luu, D., & Voilley, A. (2005). Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 973-981.
- Plazinski, W., & Plazinska, A. (2011). Molecular dynamics study of the interactions between phenolic compounds and alginate/alginic acid chains. *New Journal of Chemistry*, 35, 1607-1614.
- Pramod, K., Ansari, S. H., & Ali, J. (2010). Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. *Natural product communications*, 5(12), 1999-2006.
- Prashanth, K. V. H., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18.
- Priolo, M. A., Gamboa, D., Holder, K. M., & Grunlan, J. C. (2010). Super Gas Barrier of Transparent Polymer–Clay Multilayer Ultrathin Films. *Nano Letters*, 10(12), 4970-4974.
- Priya, S., & Maheswari, P. (2012). Carotenoids from the feathers waste of *Gallus gallus* and its antimicrobial activity. *Pollution Research*, 31(4), 507-509.
- Pujol-Lereis, L., Rabossi, A., Filiberti, A., Argaraña, C., & Quesada-Allué, L. (2006). D. melanogaster and H. irritans are more sensitive to Phloxine B phototoxicity than C. capitata. *Drosoph. Inf. Serv*, 89, 82-84.

- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Quezada-Gallo, J.-A. (2009). Delivery of food additives and antimicrobials using edible films and coatings. In *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 315-333): Springer.
- Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62(3), 373-380.
- Raabe, D., Al-Sawalmih, A., Yi, S., & Fabritius, H. (2007). Preferred crystallographic texture of α -chitin as a microscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Acta biomaterialia*, 3(6), 882-895.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Ramirez, E., Whitaker, J., Virador, V., Voragen, A., & Wong, D. (2003). Handbook of food enzymology. In: Marcel Dekker, New York.
- Ramos, Ó. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(6), 533-552.
- Ramyadevi, D., Subathira, A., & Saravanan, S. (2012). Potential Recovery of Protein from Shrimp Waste in Aqueous two Phase System. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2(7), 47-52.
- Raphael, E., Avellaneda, C. O., Manzolli, B., & Pawlicka, A. (2010). Agar-based films for application as polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 55(4), 1455-1459.
- Ravi Kumar, M. N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International journal of food microbiology*, 121(3), 313-327.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual review of entomology*, 57, 405-424.
- Remunan-Lopez, C., & Bodmeier, R. (1997). Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, 44(2), 215-225.
- Rhim, J.-W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, 37(3), 323-330.
- Rhim, J.-W., Mohanty, K. A., Singh, S. P., & Ng, P. K. (2006). Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and poly (lactide). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3059-3066.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2000). Solubility, Tensile, and Color Properties of Modified Soy Protein Isolate Films†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4937-4941.
- Rickert, D. A., Meyer, M. A., Hu, J., & Murphy, P. A. (2004). Effect of Extraction pH and Temperature on Isoflavone and Saponin Partitioning and Profile During Soy Protein Isolate Production. *Journal of food science*, 69(8), C623-C631.
- Richert, L., Boulmedais, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C., & Picart, C. (2003). Improvement of Stability and Cell Adhesion Properties of Polyelectrolyte Multilayer Films by Chemical Cross-Linking. *Biomacromolecules*, 5(2), 284-294.

- Richter, S., Boyko, V., & Schröter, K. (2004). Gelation Studies on a Radical Chain Cross-Linking Copolymerization Process: Comparison of the Critical Exponents Obtained by Dynamic Light Scattering and Rheology. *Macromolecular rapid communications*, 25(4), 542-546.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Ritthidej, G. C., Phaechamud, T., & Koizumi, T. (2002). Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, 232(1-2), 11-22.
- Rivero, S., García, M., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of food engineering*, 90(4), 531-539.
- Rizzarelli, P., Puglisi, C., & Montaudo, G. (2004). Soil burial and enzymatic degradation in solution of aliphatic co-polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, 85(2), 855-863.
- Roberts, G. A. F., & Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(6), 374-377.
- Rødde, R. H., Einbu, A., & Vårum, K. M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*, 71(3), 388-393.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., & McHugh, T. H. (2006). Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9262-9267.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., & McHugh, T. H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 634-641.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438-447.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat science*, 62(2), 165-177.
- Romero, A., Verwijlen, T., Guerrero, A., & Vermant, J. (2013). Interfacial behaviour of crayfish protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 470-476.
- Rosa, R., & Barracco, M. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr Surviv J*, 7, 262-284.
- Rosa, R., & Nunes, M. L. (2004). Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(1), 89-94.
- Rosenthal, A., Pyle, D., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 402-420.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681-687.
- Rotta, J., Ozório, R. Á., Kehrwald, A. M., de Oliveira Barra, G. M., de Melo Castanho Amboni, R. D., & Barreto, P. L. M. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 619-623.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841-845.
- Rydhaag, L., & Wilton, I. (1981). The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(8), 830-837.

- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621-632.
- Sachindra, N. M., & Bhaskar, N. (2008). *In vitro* antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. *Bioresource Technology*, 99(18), 9013-9016.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 167-172.
- Sachindra, N., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26(10), 1092-1098
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2012). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 374-381.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 73(1), 74-84
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccielli, S., & Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24(5), 525-533.
- Salmieri, S., & Lacroix, M. (2006). Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10205-10214.
- Sánchez-Camargo, A. P., Almeida Meireles, M. Â., Lopes, B. L. F., & Cabral, F. A. (2011). Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *Journal of Food Engineering*, 102(1), 87-93.
- Sánchez-Camargo, A. P., Martínez-Correa, H. A., Paviani, L. C., & Cabral, F. A. (2011). Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 56(2), 164-173.
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 246-253.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 443-452.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16.
- Sathivel, S. (2005). Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets During Frozen Storage. *Journal of food science*, 70(8), e455-e459.
- Sato, K., Krist, S., & Buchbauer, G. (2006). Antimicrobial effect of trans-cinnamaldehyde, (-)-perillaldehyde, (-)-citronellal, citral, eugenol and carvacrol on airborne microbes using an airwasher. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2292-2294.
- Scanlan, J. C., & Winter, H. H. (1991). Composition dependence of the viscoelasticity of end-linked poly (dimethylsiloxane) at the gel point. *Macromolecules*, 24(1), 47-54.
- Scott, G. (1990). Photo-biodegradable plastics: Their role in the protection of the environment. *Polymer Degradation and Stability*, 29(1), 135-154.
- Schmidt, G. H., & Streloke, M. (1994). Effect of *Acorus calamus* (L.) (Araceae) oil and its main compound β -asarone on *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*, 30(3), 227-235.

- Schoene, N. W., Kelly, M. A., Polansky, M. M., & Anderson, R. A. (2005). Water-soluble polymeric polyphenols from cinnamon inhibit proliferation and alter cell cycle distribution patterns of hematologic tumor cell lines. *Cancer letters*, 230(1), 134-140.
- Schultz, T. H., Flath, R. A., Mon, T. R., Eggling, S. B., & Teranishi, R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 25(3), 446-449.
- Sellamuthu, P. S., Sivakumar, D., & Soundy, P. (2013). Antifungal Activity and Chemical Composition of Thyme, Peppermint and Citronella Oils in Vapor Phase against Avocado and Peach Postharvest Pathogens. *Journal of Food Safety*, 33(1), 86-93.
- Senphan, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Characteristics and antioxidative activity of carotenoprotein from shells of Pacific white shrimp extracted using hepatopancreas proteases. *Food Bioscience*(In Press).
- Seydim, A., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.
- Seymour, T. A., Li, S. J., & Morrissey, M. T. (1996). Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(3), 682-685.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265.
- Shahidi, F., & Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in food and nutrition research*, 49, 93-135.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2009). Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1879-1885.
- Shellhammer, T. H., & Krochta, J. M. (1997). Whey Protein Emulsion Film Performance as Affected by Lipid Type and Amount. *Journal of food science*, 62(2), 390-394.
- Shepherd, R., Reader, S., & Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate journal*, 14(4), 535-542.
- Sikkema, J., De Bont, J., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8022-8028.
- Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P., & Gómez-Guillén, M. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 458-466.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P., Gómez-Guillén, M., & Bifani, V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, 1-17.
- Silva, S. S., Santos, M. I., Coutinho, O. P., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2005). Physical properties and biocompatibility of chitosan/soy blended membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(6), 575-579.
- Silva, W., Dória, G., Maia, R., Nunes, R., Carvalho, G., Blank, A., Alves, P., Marçal, R., & Cavalcanti, S. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, 99(8), 3251-3255.
- Simon, R. (1992). Pulmonary reactions to sulfites in foods. *Pediatric Allergy and Immunology*, 3(4), 218-221.
- Simpson, B., Gagne, N., Ashie, I., & Noroozi, E. (1997). Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology*, 11(1), 25-44.
- Singh, A., Deka, B., & Kumar, P. (2012). Strawberry cultivation for higher return. In *Production Techniques*.
- Singh, G., & Maurya, S. (2005). Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils: an overview. *Natural Product Radiance*, 4, 179-192.

- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102-108.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3197-3201.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2), 118-122.
- Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine drugs*, 8(4), 1213-1262.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.
- Sobral, P. d. A., Menegalli, F., Hubinger, M., & Roques, M. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 423-432.
- Soliman, E. A., Tawfik, M. S., Hosni, E., & Moharram, Y. G. (2007). Preparation and characterization of soy protein based edible/biodegradable films. *American Journal of Food Technology*, 2(6), 462-476.
- Solomon, B., Sahle, F., Gebre-Mariam, T., Asres, K., & Neubert, R. (2012). Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and *in vitro* permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(1), 61-66.
- Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., & Wu, Q. (2013). Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 43, 538-544.
- Songkro, S., Hayook, N., Jaisawang, J., Maneenuan, D., Chuchome, T., & Kaewnopparat, N. (2012). Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 72(3-4), 339-355.
- Sowmya, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. M. (2011). An Autolytic Process for Recovery of Antioxidant Activity Rich Carotenoprotein from Shrimp Heads. *Marine Biotechnology*, 13(5), 918-927.
- Specos, M. M. M., García, J. J., Tornesello, J., Marino, P., Vecchia, M. D., Tesoriero, M. V. D., & Hermida, L. G. (2010). Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(10), 653-658.
- Speiciene, V., Guilmineau, F., Kulozik, U., & Leskauskaitė, D. (2007). The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chemistry*, 102(4), 1048-1054.
- SPI. (2013). About Plastics. In (Vol. 2013). In: <https://www.plasticsindustry.org/> [Consulta: jueves, 10 de octubre de 2013]
- Stewart, D. (2008). Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*, 27(2), 202-207.
- Strauss, G., & Gibson, S. M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 81-89.
- Sudarshan, N., Hoover, D., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257-272.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(3), 128-131.
- Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N., & Hasegawa, Y. (1980). A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33(4), 787-793.

- Sun, D., Liang, G., Xie, J., Lei, X., & Mo, Y. (2010). Improved preservation effects of litchi fruit by combining chitosan coating with ascorbic acid treatment during postharvest storage. *African Journal of Biotechnology*, 9(22), 3272-3279.
- Sun, J.-Y., Zhao, X., Illeperuma, W. R., Chaudhuri, O., Oh, K. H., Mooney, D. J., Vlassak, J. J., & Suo, Z. (2012). Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*, 489(7414), 133-136.
- Sun, T., Yao, Q., Zhou, D., & Mao, F. (2008). Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(21), 5774-5776.
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. (2005). Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3950-3957.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. A. Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food Chemistry*, 68(2), 147-152.
- Tang, Y.-F., Du, Y.-M., Hu, X.-W., Shi, X.-W., & Kennedy, J. F. (2007). Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 491-499.
- Tarelli, G., Zerba, E., & Alzogaray, R. A. (2009). Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 102(3), 1383-1388.
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78.
- TheDeliGarage. (2013) (Vol. 2013). <http://the-deli-garage.de/> [Consulta: viernes, 03 de enero de 2014]
- Thorsell, W., Mikiver, A., Malander, I., & Tunon, H. (1998). Efficacy of plant extracts and oils as mosquito repellents. *Phytomedicine*, 5(4), 311-323.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O' Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987-6000.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K., & Mori, Y. (1997). Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydrate Research*, 303(3), 353-358.
- Tripathi, A., Prajapati, V., Verma, N., Bahl, J., Bansal, R., Khanuja, S. P. S., & Kumar, S. (2002). Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* (var. ch-66) on three species of stored-product beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology*, 95(1), 183-189.
- Trisyono, Y. (2012). Effects of citronella grass extract on the oviposition behavior of Carambola fruit fly (*Bactrocera carambolae*) in mango. *Journal of Agricultural & Biological Science*, 7(9), 672.
- Troller, J. A. (1980). Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food technology*, 34.
- Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., & Apiwathnasorn, C. (2005). Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, 19(4), 303-309.
- TrulyDeeply. (2013). Wiki-Cell-skin. In (Vol. 2013). <http://www.trulydeeply.com.au/madly/2012/06/20/biomimicrys-edible-packaging-for-food-and-cocktails/wiki-cell-skin/> [Consulta: viernes, 03 de enero de 2014]
- Tsaih, M. L., & Chen, R. H. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of applied polymer science*, 88(13), 2917-2923.
- Tsigos, I., & Bouriatis, V. (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Biol Chem*, 270(44), 26286-26291.

- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18(7), 305-312.
- Tzortzakis, N. G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 111-116.
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of food science*, 77(1), R11-R24.
- UNE87-006-92. (1992). Prueba Triangular. In *Análisis sensorial. Metodología*. Madrid, Spain: Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR).
- USDA. (2013). USDA Scheduled Release Dates for Agency Reports and Summaries. In U. S. D. o. Agriculture (Ed.). http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=AGENCY_REPORTS [Consulta: lunes, 11 de noviembre 2013]
- Valdez-Peña, A., Espinoza-Perez, J., Sandoval-Fabian, G., Balagurusamy, N., Hernandez-Rivera, A., De-la-Garza-Rodriguez, I., & Contreras-Esquivel, J. (2010). Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), 553-557.
- Van de Velde, K., & Kiekens, P. (2002). Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*, 21(4), 433-442.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 164-171.
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.
- Vaz, C. M., de Graaf, L. A., Reis, R. L., & Cunha, A. M. (2003). In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. *Polymer Degradation and Stability*, 81(1), 65-74.
- Veiga-Santos, P., Oliveira, L. M., Cereda, M. P., Alves, A. J., & Scamparini, A. R. P. (2005). Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 341-349.
- Vinardell, M., Ugartondo, V., & Mitjans, M. (2008). Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crops and Products*, 27(2), 220-223.
- Vink, E. T. H., Rábago, K. R., Glassner, D. A., & Gruber, P. R. (2003). Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3), 403-419.
- Vyas, P. (2013). Essential oils from plants: A Review. *International Journal of Chemtech Applications (INTJCA) An Open Access Free Online Scientific Journal*, 2(1).
- Wagner, T., & Finne, G. (1986). Evaluation of alternatives to sulfiting agents as melanosis inhibitors in raw shrimp. In *Proceedings of the Eleventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference of the Americas* (pp. 23-34): Texas Agricultural Extension Service, Marine Advisory Service Program.
- Wang, J. J., Lin, T., Li, J. B., Liao, C., Pan, Y. J., & Zhao, Y. (2014). Effect of acidic electrolyzed water ice on quality of shrimp in dark condition. *Food Control*, 35(1), 207-212.
- Wang, M., Leitch, M., & Xu, C. (2009). Synthesis of phenol–formaldehyde resol resins using organosolv pine lignins. *European Polymer Journal*, 45(12), 3380-3388.
- Wang, S.-L., Chang, T.-J., & Liang, T.-W. (2010). Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. *Biodegradation*, 21(3), 321-333.

- Wang, Q., Hu, X., Du, Y., & Kennedy, J. F. (2010). Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 82, 842-847.
- Wang, R., Wang, R., & Yang, B. (2009). Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 289-292.
- Watkins, C., & Thompson, C. (1992). An evaluation of microperforated polyethylene film bags for storage of 'Cox's Orange Pippin' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 2(2), 89-100.
- Wendakoon, C., & Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of food protection*, 58(3), 280-283.
- Westendorf, M. L. (2000). *Food waste to animal feed*: Wiley. com.
- Win, N., & Stevens, W. (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 334-341.
- WISHH. (2013). About Soy. In (Vol. 2013). <http://soygrowers.com/international-programs/wishh/> [Consulta: lunes, 18 de noviembre 2013]
- Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 969-976.
- Wright, D. J., Leach, I. B., & Wilding, P. (1977). Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(6), 557-564.
- Wu, R.-L., Wang, X.-L., Li, F., Li, H.-Z., & Wang, Y.-Z. (2009). Green composite films prepared from cellulose, starch and lignin in room-temperature ionic liquid. *Bioresource Technology*, 100(9), 2569-2574.
- Wu, Y., Rhim, J. W., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S., & Schnepf, M. (2000). Moisture Loss and Lipid Oxidation for Precooked Beef Patties Stored in Edible Coatings and Films. *Journal of food science*, 65(2), 300-304.
- Xing, R., Liu, S., Guo, Z., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, Z., & Li, P. (2005). Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(5), 1573-1577.
- Xu, Y., Ren, X., & Hanna, M. A. (2006). Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *Journal of applied polymer science*, 99(4), 1684-1691.
- Yaghoobi, N., & Mirzadeh, H. (2004). Enhancement of Chitin's Degree of Deacetylation by Multistage Alkali Treatments. *Iranian Polymer Journal*, 131-136.
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyaya, Y., Saiganji, A., & Tani, Y. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability*, 72(2), 323-327.
- Yamada, K., Chen, T., Kumar, G., Vesnovsky, O., Topoleski, L. T., & Payne, G. F. (2000). Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue. *Biomacromolecules*, 1(2), 252-258.
- Yamada, S., Tanaka, Y., Sameshima, M., & Ito, Y. (1990). Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids: I. Effect of dietary astaxanthin, β -carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture*, 87(3-4), 323-330.
- Yang, P., & Ma, Y. (2005). Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. *Journal of vector ecology*, 30(2), 231.
- Yang, Y., Campanella, O. H., Hamaker, B. R., Zhang, G., & Gu, Z. (2013). Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations. *Food Hydrocolloids*, 30, 26-32.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H., & Mau, J.-L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 15-21.

- Yu, S.-H., Hsieh, H.-Y., Pang, J.-C., Tang, D.-W., Shih, C.-M., Tsai, M.-L., Tsai, Y.-C., & Mi, F.-L. (2013). Active films from water-soluble chitosan/cellulose composites incorporating releasable caffeic acid for inhibition of lipid oxidation in fish oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 9-19.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of chitosan: Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, 4(8), 1399-1416.
- Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., & Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81(4), 686-692.
- Zhang, P., & Whistler, R. L. (2004). Mechanical properties and water vapor permeability of thin film from corn hull arabinoxylan. *Journal of applied polymer science*, 93(6), 2896-2902.
- Zhang, P., Zhang, E., Xiao, M., Chen, C., & Xu, W. (2013). Enhanced chemical and biological activities of a newly biosynthesized eugenol glycoconjugate, eugenol α -D-glucopyranoside. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1043-1050.
- Zhang, Y., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., & Fu, X. (2006). Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 229-234.
- Zhang, Z., & Cui, H. (2012). Biodegradability and biocompatibility study of poly (chitosan-g-lactic acid) scaffolds. *Molecules*, 17(3), 3243-3258.
- Zhao, B., Chen, G., Liu, Y., Hu, K., & Wu, R. (2001). Synthesis of lignin base epoxy resin and its characterization. *Journal of materials science letters*, 20(9), 859-862.
- Zhao, Y. (2007). OSU Research-Results that matter. In. http://oregonstate.edu/admin/President/2007Report/research_secondary.php [Consulta: viernes, 03 de enero de 2014]
- Zhao, Y., Park, R.-D., & Muzzarelli, R. A. (2010). Chitin deacetylases: properties and applications. *Marine drugs*, 8(1), 24-46.
- Zheng, L.-Y., & Zhu, J.-F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.
- Zhong, Y., Song, X., & Li, Y. (2011). Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 335-342.
- Zhou, H. Y., Chen, X. G., Kong, M., Liu, C. S., Cha, D. S., & Kennedy, J. F. (2008). Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 265-273.
- Zhou, N., & Mulvaney, S. (1998). The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2561-2571.
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1), M45-M51.

X. Resumen Ampliado^[2]

[2] Este resumen ampliado se presenta en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

Introducción

En la actualidad existe una gran preocupación por la elevada cantidad de residuos generados en la industria. La necesidad de reducir el uso de envases plásticos obtenidos a partir de materiales derivados del petróleo, con el consiguiente problema medioambiental que supone su eliminación, ha contribuido a la obtención y desarrollo de materiales de envasado a partir de materias primas de origen natural de bajo coste como son los residuos y recursos infrautilizados de la industria procesadora de alimentos y agricultura (Mayes, Massawe, Alderson, Roberts, Azam-Ali, y Hermann, 2011).

El aprovechamiento de estos materiales disminuye el impacto en el ambiente y facilita su manejo sostenible (FAO, 1997), lo que permite el desarrollo de envases y recubrimientos que pueden mejorar sus propiedades fisicoquímicas o incluso tener capacidad funcional mediante la incorporación de compuestos activos que actúen como bioconservadores en los alimentos.

Los residuos procedentes de la industria de crustáceos son altamente perecederos, si bien constituyen una fuente importante de proteínas, péptidos bioactivos, minerales, lípidos y pigmentos (Kim y Mendis, 2006; Pérez-Santín, Calvo, López-Caballero, Montero, y Gómez-Guillén, 2013). A su vez, la acumulación de estos materiales representa un verdadero problema ambiental (Sachindra, Bhaskar, y Mahendrakar, 2005) y su eliminación un coste elevado en las industrias procesadoras. Parte de los crustáceos se comercializan enteros y por tanto los residuos son a nivel doméstico, pero en general, de los crustáceos tan solo se aprovecha la parte noble (el músculo), que supone entre el 20-40% dependiendo de la especie; el resto constituye el residuo (Khan y Nowsad, 2013).

El desarrollo de métodos de extracción eficientes que permitan el máximo aprovechamiento de los residuos generados puede dar lugar a la recuperación de materias primas con propiedades tecnológicas interesantes. Los residuos de crustáceos se utilizan principalmente para obtener quitosano, material activo con capacidad filmogénica (Gildberg y Stenberg, 2001), y también pueden ser fuente de lípidos, proteínas, pigmentos (por ejemplo, astaxantina), etc., (Armenta-López, Guerrero, y Huerta, 2002; De Holanda y Netto, 2006; Gagne y Simpson, 1993; Gildberg y Stenberg, 2001; Khan y Nowsad, 2013). Algunos de estos materiales presentan propiedades activas potencialmente útiles para la industria de alimentos, como la antimicrobiana que manifiesta el quitosano y la antioxidante, típica de los pigmentos carotenoides y péptidos, entre otras.

Además de los ya mencionados, otros materiales biopoliméricos procedentes de la acuicultura como el alginato y el agar son productos muy abundantes en la naturaleza, con un sinnúmero de aplicaciones ampliamente referidas en la literatura (López-Caballero, Giménez, Gómez-Guillén, y Montero, 2013) y con un enorme potencial aún por explorar. Por otro lado, productos procedentes de la agricultura como la soja, a pesar de su abundancia es una especie infrautilizada, por lo que la posibilidad de nuevas aplicaciones es un campo de gran interés. Todos estos biopolímeros citados tienen en común, entre otras propiedades, su potencial filmogénico (Aider, 2010; Rhim, 2004; Rhim, Mohanty, Singh, y Ng, 2006).

Entre los materiales activos cabe citar la lignina y los aceites esenciales. La lignina, un residuo infrautilizado de la industria papelera (Lora y Glasser, 2002), por sus propiedades de barrera a la luz y antioxidante (Núñez-Flores, Giménez, Fernández-Martín, López-Caballero, Montero, y Gómez-Guillén, 2013) contribuye a la conservación de alimentos. En cuanto a los aceites esenciales, alguno de ellos se han incorporado con éxito, no solo para mejorar las propiedades físicas y bioactivas de las películas (Joaquín Gómez-Estaca, Bravo, Gómez-Guillén, Alemán, y Montero, 2009; Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier, y Lacroix, 2004), sino para aumentar la vida útil de los alimentos (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, y Martín-Belloso, 2009). La búsqueda de aceites más adecuados, con mayor poder antimicrobiano e incluso insecticida, sería también de gran interés, y en principio su elección dependerá de la actividad que se desee conferir y del alimento o uso al que se destine. El principal inconveniente en el empleo de los aceites esenciales es el cambio que pueden producir en las propiedades organolépticas de los alimentos, de ahí la importancia de desarrollar nuevas técnicas de incorporación y aplicación en películas biodegradables.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el diseño y el desarrollo de recubrimientos a media de las necesidades específicas a cubrir en el campo de la alimentación y agricultura, supone un verdadero reto tecnológico.

Objetivos

El objetivo general de la presente memoria es el diseño y elaboración de recubrimientos, a partir de hidrocoloides y compuestos activos procedentes de recursos infrautilizados y residuos de la industria, para su aplicación en agroalimentación.

La consecución de este objetivo se llevará a cabo mediante los siguientes objetivos parciales:

1. Valorización de los residuos de la industria procesadora de crustáceos y obtención del material polimérico y activo, principalmente quitosano, proteínas, lípidos y carotenoides, mediante métodos respetuosos con el medio ambiente y manteniendo su funcionalidad.
2. Diseño y desarrollo de recubrimientos con el material obtenido de los residuos de crustáceos y caracterización de sus propiedades tecnológicas y activas.
3. Aplicación de recubrimientos de quitosano y extractos lipoproteicos de crustáceos a productos de la pesca y acuicultura durante la conservación en estado refrigerado
4. Diseño y desarrollo de recubrimientos en bicapa a partir de agar o de alginato con la incorporación de aceites esenciales, caracterización de sus propiedades y su aplicación en alimentos.
5. Diseño y desarrollo de películas en bicapa de proteína de soja, lignina y aceites esenciales con actividad insecticida y fungicida para su aplicación en agro cultivos y evaluación de su estabilidad y biodegradabilidad.

Resultados

Recuperación de material activo a partir de residuos de langostino (*Litopenaeus vannamei*) y desarrollo de recubrimientos comestibles

Los residuos de *L. vannamei* inicialmente se utilizaron para la obtención de quitosano mediante dos métodos: desacetilación de la quitina previa desproteización de los caparazones y desacetilación química directa de los evitando la etapa de desproteización (obtención de quitina). Otros factores de proceso ensayados fueron la adición de un agente reductor (NaBH_4) y el tiempo de desacetilación (2 y 4 horas). Se obtuvieron por tanto 8 tipos diferentes de quitosano según las combinaciones de estos factores que presentaron un alto grado de desacetilación (GD, %), superior al 70% y cuyo peso molecular fue mayor al utilizar el agente reductor y tiempos cortos (2 h) de desacetilación. El paso por quitina, cuya desacetilación se lleva a cabo tradicionalmente con 50% p/v de NaOH (12,5 M) y a elevadas temperaturas (No and Meyers 1995; Muzzarelli and Peter 1997; Nessa, Masum *et al.*, 2010), no fue necesario a la hora de obtener quitosano, cuya solubilidad y propiedades fue comparable a la de los comerciales. En este sentido, el presente trabajo supone una mejora desde el punto de vista tecnológico, económico y medioambiental.

Además de la obtención eficiente de quitosano, se diseñó un proceso de extracción que implica el aprovechamiento integral de los residuos de crustáceos, ya que son una excelente fuente de proteínas, grasa y pigmentos. La extracción se planteó de manera que el material recuperado pudiera utilizarse como aditivo o ingrediente para consumo humano, por lo que se minimizó el uso de productos químicos. Mediante una autólisis moderada (40 °C, 4h), y posterior secuencia de extracciones en diversas fases se extrajeron compuestos de distinta naturaleza, que manifiestan a su vez diferentes propiedades biológicas: extracto lipídico rico en carotenoides (CE), extracto lipoproteico (PCc) e hidrolizados de proteínas (HPc) procedente de la hidrólisis de este extracto con alcalasa y un residuo quitinoso que a su vez se unió con la fracción de la cutícula que permanecía insoluble. De esta fracción insoluble, por centrifugación, se obtuvo un nuevo concentrado lipoproteico (PCw) y un material quitinoso, que se sometió a una desmineralización con ácido láctico (75,6 g/L). La separación del material proteico de la quitina se llevó a cabo mediante una hidrólisis enzimática en dos etapas con Viscozyme L y Alcalasa, con un rendimiento del 99,9%, obteniéndose así un hidrolizado proteico (HPch) y quitina. La presencia de un complejo caroteno-proteína rico en astaxantina fue evidente en todos los concentrados activos obtenidos.

La quitina fue el material de partida para la obtención de quitosano mediante una modificación al método anterior, con una reducción del 20% en peso de NaOH durante la desacetilación. Este quitosano (Ch40) presentó un GD del 84%. Posteriormente, mediante optimización del método de desacetilación y con una reducción de NaOH en un 80% en peso se obtuvo quitosano (Ch10) con un GD de 74%. Este nuevo proceso de obtención del quitosano mediante un método combinado secuencial enzimático y desacetilación con consumo reducido de agentes químicos y con recuperación de material proteico, supone una gran novedad que no ha sido referida con anterioridad en la literatura. Este proceso es amigable con el medio ambiente, además de rentable tecnológica y económicamente.

Con objeto de ahondar en el proceso de desacetilación otra alternativa ensayada fue la aplicación de un método biológico, con la utilización de extractos crudos enzimáticos de quitina-desacetilasa obtenida a partir de los mohos *Mucor rouxii* y *Colletotrichum Lindemuthianum*. La quitina se depolimerizó con diversos tratamientos químicos (metanol y ácido fórmico) para facilitar la acción de la enzima. Sin embargo, el proceso no fue lo suficiente efectivo como para obtener quitosanos con un alto grado de solubilidad y desacetilación. Con el fin de aumentar esta desacetilación, la quitina se sometió previamente a un tratamiento con NaOH a concentración moderada (30% p/v), lo que permitió a la enzima actuar con mayor facilidad y mejorar el GD. A pesar de ello, la desacetilación por este sistema continúa siendo

inferior a la obtenida con el 10% p/v de NaOH, por lo que no se consideró como un método eficaz para la obtención de quitosano.

Los diferentes materiales obtenidos se caracterizaron para evaluar su capacidad filmogénica y bioactiva. En primer lugar se estudiaron los 8 quitosanos obtenidos con la primera metodología. Todos los quitosanos presentaron actividad antimicrobiana en solución filmogénica y los microorganismos más sensibles fueron *Debaroyces hansenii* y *Bacillus coagulans*. Los quitosanos con mayor actividad se seleccionaron para el desarrollo de recubrimientos (ChQ4, ChR2 y ChR4) con varios tiempos de secado (12 y 24 h) y se acondicionaron a diferentes humedades relativas (58%, 75% y 90%). La actividad antimicrobiana fue mayor cuanto mayor humedad relativa y menor tiempo de secado en las películas, lo que se atribuye a que el incremento en el contenido de agua aumenta los sitios activos (grupos amino protonados) y mejora la actividad antimicrobiana del quitosano.

En cuanto a las propiedades reológicas, todos los quitosanos presentaron un comportamiento viscoso similar a un fluido newtoniano a bajas concentraciones (1% p/v). Sin embargo a concentraciones superiores (3% p/v) y, de manera especial en los quitosanos de bajo peso molecular) se obtuvieron los valores menores de módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') a bajas temperaturas ($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Por el contrario, los quitosanos de alto peso molecular (sufrieron un aumento drástico en los valores de G' , característico de un comportamiento tipo elástico en la que $G' > G''$). Excepcionalmente, el quitosano ChQ4 mostró una elevada resistencia a la deformación y viscosidad a las temperaturas ensayadas (5, 20 y $40\text{ }^{\circ}\text{C}$), lo que lo hace especialmente idóneo para su aplicación como recubrimiento en alimentos. A pesar de las diferencias, todos los quitosanos presentaron propiedades filmogénicas y formadoras de película.

Los quitosanos obtenidos tras la autólisis durante el aprovechamiento integral de residuos (Ch40 y Ch10), se seleccionaron como material biopolimérico para el desarrollo de recubrimientos. Además, entre el material activo recuperado para incorporarlo en las formulaciones, se seleccionaron los extractos de naturaleza lipoproteica (PCc) y carotenoide (CE) por sus propiedades bioactivas. Tanto en solución filmogénica como en película o cobertura, la adición de PCc incrementó considerablemente las propiedades antioxidantes (FRAP y ABTS) de los recubrimientos debido a la presencia de astaxantina (Liñán-Cabello, Paniagua-Michel, y Hopkins, 2002). Las propiedades antimicrobianas frente a 26 microorganismos seleccionados (patógenos, alterantes y bacterias lácticas) también mejoraron probablemente debido al efecto del concentrado lipoproteico, que se carga positivamente a

pH ácido y a la presencia de péptidos antimicrobianos originados durante la extracción de concentrado PCc. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, las películas desarrolladas con quitosano Ch10 y concentrado PCc presentaron buena barrera a la luz. Además, la presencia de PCc aportó mayor rigidez probablemente debido a una agregación parcial y por su contenido en lípidos, que pudieran favorecer una emulsión en la matriz polimérica, y que confiere mayor insolubilidad a la película.

Aplicación de coberturas en langostino

Debido a los buenos resultados en cuanto a propiedades filmogénicas y activas, tanto en película como en cobertura, se utilizó la formulación (CH10+ PCc) para aplicarla a langostinos enteros crudos con el objetivo de estudiar su efecto durante la conservación en estado refrigerado. La presencia de PCc en la cobertura disminuye la viscosidad de la solución filmogénica de manera acusada, que aun así fue adecuada para adherirse y reducir la flora microbiana durante la conservación en estado refrigerado. Esta cobertura fue especialmente eficaz, incluso tras 10 días de conservación, frente a microorganismos productores de H₂S como *Shewanella putrefaciens*, organismo involucrado en el deterioro del pescado (López-Caballero, Martínez-Alvarez, Gómez-Guillén, y Montero, 2007). Por otro lado, los niveles de NBVT no aumentaron significativamente, lo que se atribuye al efecto conjunto beneficioso entre el quitosano y PCc. Este efecto se manifestó también a nivel sensorial, ya que retrasó la aparición de melanosis a la vez que enmascaró la astringencia característica del quitosano.

Desarrollo de películas bicapa con aceites esenciales en alimentos

Con el objetivo de evitar los cambios que produce la aplicación de aceites esenciales (AE) en las propiedades sensoriales de los alimentos, se evaluaron diversas matrices poliméricas y métodos de incorporación de estos aceites en las películas.

Los aceites esenciales poseen numerosas propiedades biológicas, lo que unido a su origen natural hace de ellos compuestos de alto valor. Entre los muchos AE con mostrada actividad antimicrobiana, se seleccionó la canela por su suave y delicado flavor para incorporarla a los recubrimientos comestibles. Uno de los retos tecnológicos planteados fue adecuar la dosis para conseguir el efecto deseado sin que se alteren las propiedades organolépticas de los alimentos y que la utilización del aceite no suponga el rechazo del consumidor. Para formular estas películas se escogieron biopolímeros que permitan la liberación controlada de los compuestos bioactivos, como es el caso de agar y de alginato. Así se diseñó una película en

bicapa en la que el compuesto activo se incorporó en la capa más externa de cada una de las matrices (agar o alginato), quedando expuesta al aire y se aplicó sobre langostinos para evaluar su efecto durante la conservación en estado refrigerado. La evaluación sensorial reveló que las películas en bicapa protegen al alimento del sabor y olor característico del AE. Estas películas fueron claras, transparentes, estables, las capas no se separaron en ningún momento, no perdieron la integridad y mantuvieron su aspecto. Asimismo presentaron propiedades antioxidantes y antimicrobianas que se asocian directamente a la presencia de cinamaldehído y eugenol, compuestos mayoritarios en el AE canela y responsables en gran parte de estas actividades (Gill y Holley, 2004). La liberación máxima de compuestos activos tuvo lugar a las 9 h en ambas películas, si bien la liberación se mantuvo incluso tras 72 h, tanto en refrigeración como a temperatura ambiente. Esta liberación fue más gradual que la observada en otras matrices. Por ejemplo, se ha descrito que la liberación de eugenol en películas de gelatina se produce en apenas 45 min y disminuye al cabo de 16 h (Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca, y Montero, 2012). En el presente estudio, ésta liberación fue controlada, gradual y acorde con la capacidad antioxidante (en ABTS y FRAP) obtenidos para las películas de agar y de alginato.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, las películas bicapa de agar inhibieron en mayor grado el crecimiento microbiano que las de alginato en *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella choleraesuis*, *Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Estas diferencias pueden estar asociadas al tipo de matriz utilizada y a un menor o mayor grado de interacción del AE con la misma.

Estas películas en bicapa con capacidad antioxidante y antimicrobiana se aplicaron a langostinos crudos pelados (*L. vannamei*) previamente inoculados con *L. monocytogenes* para evaluar su efecto frente a este patógeno y a la microflora durante la conservación en estado refrigerado. Así se observó que los recuentos de *L. monocytogenes*, tras 7 días de conservación, disminuyen en 3 ciclos logarítmicos, siendo este efecto ligeramente mayor en las películas de alginato. Sin embargo los langostinos con cobertura sin AE aumentan en 4 ciclos logarítmicos los recuentos de este patógeno. En definitiva, la utilización de películas en bicapa abre una amplia posibilidad de aplicación de los aceites esenciales durante la conservación de alimentos, protegiéndolos del deterioro y minimizando los cambios en las propiedades sensoriales de los mismos.

Desarrollo películas bicapa con aceites esenciales para su aplicación en agronomía

Con objeto de desarrollar películas con manifiestas propiedades insecticidas para su uso agroindustrial, se seleccionaron los aceites esenciales de clavo y citronela. Los aceites se incorporaron a diversos materiales poliméricos para desarrollar una matriz biodegradable y resistente a los cambios climatológicos, en especial que constituyan una barrera al agua y a la luz, que suelen ser las mayores debilidades de las películas elaboradas con biopolímeros.

La selección de los materiales poliméricos se realizó en base a su capacidad filmogénica, bajo valor comercial y a su potencial reciclado como sustrato agroindustrial. Los materiales de elección fueron la proteína del aislado de soja (SPI) y la lignina, ambos recursos infrautilizados. Las películas se desarrollaron en bicapa, con la inclusión del AE (clavo o citronela) en la capa más externa para minimizar cambios a nivel sensorial y en base a los buenos resultados obtenidos previamente. La SPI se reticuló con formaldehído para conferir mayor resistencia e insolubilidad a la matriz polimérica. Por otro lado, la lignina dotó a la película de protección contra la luz y junto con los AE aportó las propiedades biológicas.

Estas películas presentaron propiedades insecticidas frente a la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*, responsable del ataque de cultivos de gran repercusión económica. Durante el bioensayo, al cabo de 30 min de exposición con la película, el AE de clavo produjo mayor mortalidad (~90%) en las moscas que el AE de citronela (~10%). La superficie de película empleada durante el bioensayo fue determinante, en especial al utilizar el AE de clavo, ya que a mayor superficie de película, mayor fue el efecto insecticida. En el caso del AE de citronela este efecto fue mínimo, lo que puede estar asociado a una menor liberación de los compuestos activos. En general, el compuesto activo formando parte de una película suele tener menor actividad que cuando se encuentra de manera aislada, ya que frecuentemente interacciona con la matriz que los contiene (Joaquín Gómez-Estaca, Bravo, Gómez-Guillén, Alemán, y Montero, 2009; J Gómez-Estaca, Giménez, Montero, y Gómez-Guillén, 2009). El desarrollo de estas películas con efecto insecticida y repelente supone un aspecto innovador en el envasado activo, así como su potencial aplicación en el campo de la agronomía.

En esta línea, y en un intento de simular las condiciones de utilización de los plásticos empleados para la protección de cultivos, se seleccionó una película de SPI-reticulada y lignina a la que se incorporó AE de citronela. Estas películas se almacenaron bajo condiciones medioambientales o controladas (58% de HR y 21 °C) durante 1, 3 y 6 meses para evaluar la liberación de los compuestos activos (citronelal y geraniol) y la estabilidad ante factores externos medioambientales como el agua, desecación, etc., y su potencial biodegradación en

el suelo una vez desechadas. Los resultados muestran que las películas fueron una excelente barrera al agua (probablemente por la reticulación con formaldehído) , mantuvieron su integridad, las capas no se separaron y resultaron una óptima barrera a la luz, efecto atribuido a la presencia de lignina (Núñez-Flores, Giménez, Fernández-Martín, López-Caballero, Montero, y Gómez-Guillén, 2013). Además, la liberación de citronelal y de geraniol fue mayor en las películas acondicionadas (a 58% de HR y 21 °C) que las mantenidas al ambiente. Durante el periodo de almacenamiento, la agregación de la proteína aumenta con el tiempo. En todas las películas, al cabo de seis meses se produce una drástica disminución en la concentración de AE. Estos resultados se asocian principalmente a la evaporación de los compuestos activos desde la matriz por exposición a los factores ambientales. A pesar de ello, todas las películas durante las conservación presentaron actividad antimicrobiana frente al hongo *Fusarium oxysporum*, microorganismo responsable del “Mal de Panamá”, enfermedad que afecta irreversiblemente a las plantaciones de plátano y que genera cuantiosas pérdidas a esta industria.

En base a estos resultados, a continuación se un estudio de con el fin de evaluar el efecto de los recubrimientos sobre el plátano canario (*Musa acuminata* Colla AAA). Para ello, las películas en bicapa con y sin aceite esencial de citronela, se microperforaron para recubrir los plátanos a modo de bolsa (evitando el contacto directo entre la bolsa y el fruto) y se almacenaron a 15 °C durante 6 días. En este período se registró un descenso en la microbiota de los plátanos por efecto de las películas (con o sin AE), si bien fue mayor en presencia del AE. Probablemente las películas generan una atmósfera antimicrobiana por la presencia y liberación de compuestos volátiles activos del AE en la fase de vapor, según describe (Goni, López, Sánchez, Gómez-Lus, Becerril, y Nerín, 2009). El empleo de estas películas no produjo cambios en las propiedades organolépticas del alimento, ya que panel de catadores no fue capaz de discriminar entre tratamientos.

Los polímeros comerciales y en especial los derivados del petróleo tienen una gran carencia, que es la falta o lenta degradabilidad. Este hecho hace que los envases y recubrimientos a partir de matrices biopoliméricas cobren un especial interés, aunque en general carezcan de la versatilidad que poseen los plásticos convencionales y sus derivados. Las películas almacenadas (58% HR y 21°C) durante 1, 3 y 6 meses se sometieron a un estudio de biodegradación. Durante este periodo se observó que todas las películas, una vez depositadas en el suelo y con independencia del tiempo, mostraron una pérdida de peso de alrededor del 30% en un mes. Esta degradación es muy rápida si se compara con los polímeros sintéticos convencionales. Este hecho puede estar asociado a la pérdida de compuestos solubles como el

glicerol, proteína poco reticulada, actividad microbiana y degradación enzimática al estar en contacto con la tierra. Este tipo de cambios se han descrito previamente durante la degradación de películas de proteína de soja sin reticulación (Lodha y Netravali, 2005). Los resultados obtenidos con las películas bicapa en cuanto a liberación de compuestos activos, actividades biológicas (antioxidante, insecticida, antimicrobiana, entre otras) y biodegradación, abre la posibilidad de su utilización como una alternativa que contribuye a reducir el problema de contaminación actual.

Conclusiones

1. El aprovechamiento integral de los residuos de crustáceos dio lugar a la obtención de materiales con alto valor funcional como quitosano, concentrados e hidrolizados de naturaleza lipoproteica y carotenoides.
2. La obtención de quitosano a partir de la cutícula de crustáceos se optimizó mediante un método químico suave y más respetuoso con el medio ambiente con la recuperación total de proteína (41% de la cutícula), a través de la desproteínización con alcalasa y viscozyme y la desacetilación con una reducción desde el 12,5 M al 2,5 M de NaOH (80% en peso)
3. Los diversos procesos de extracción dan lugar a quitosanos que destacan por su capacidad filmogénica y antimicrobiana. Los materiales activos ricos en proteína, lípidos y carotenoides son aditivos versátiles en la formulación de recubrimientos en base a quitosano, manteniendo o incluso mejorando su actividad antioxidante y antimicrobiana, tanto en solución filmogénica como en películas y coberturas.
4. Las coberturas en base a quitosano obtenido con el método químico suave y la incorporación del concentrado lipoproteico mejora la calidad microbiológica, retrasa la aparición de melanosis, no se detecta sensorialmente y aumenta en un 30% la vida útil de langostinos durante su conservación en estado refrigerado.
5. El desarrollo de películas bicapa de agar o de alginato permiten la difusión de los compuestos antioxidantes y antimicrobianos del aceite esencial de canela hacia el alimento minimizando los cambios en sus atributos sensoriales e inhiben eficazmente a *Listeria monocytogenes* y a los microorganismos del deterioro durante la conservación de langostinos crudos en estado refrigerado.
6. Las películas bicapa con proteína de aislado de soja reticulada y lignina con aceite esencial de clavo o citronela permiten una marcada difusión de compuestos bioactivos volátiles,

ejerciendo un efecto repelente y además una acentuada actividad insecticida con el aceite esencial de clavo frente a la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*.

7. Las películas bicapa de proteína aislada de soja y lignina con aceite esencial de citronela inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, y mantienen esta actividad después de seis meses de almacenamiento, tanto expuestas a condiciones ambientales como controladas (58% HR, 21 °C), además son excelente barrera a la luz y al agua, no modifican las propiedades organolépticas cuando se aplican sobre plátanos (*Musa acuminata* Colla AAA) y son biodegradables en el medio ambiente en 30 días.

Conclusión general

La estrategia seleccionada para el diseño y desarrollo de recubrimientos activos en mono o bicapa depende del biopolímero, material activo y el fin al que se destine, diversificando su funcionalidad y aplicación. Esta estrategia permite valorizar recursos infrautilizados o residuos de la industria con capacidad filmogénica, poder antioxidante, antimicrobiano e insecticida que no alteran las propiedades organolépticas de los alimentos y son altamente biodegradables una vez desechados.

Aportaciones fundamentales de la tesis doctoral

La presente Memoria propone nuevos métodos para el desarrollo de recubrimientos, ya sea con la obtención de biopolímeros y material activo o con nuevas alternativas de utilización de los recursos infrautilizados. Los métodos de extracción desarrollados y mejorados han sido concebidos desde el punto de vista ambiental, por lo que son más suaves y ecológicos. Con estos métodos se consigue además obtener materiales con propiedades funcionales que se mantienen incluso cuando se incorporan como ingredientes dentro de una formulación.

El presente estudio propone asimismo la obtención de material activo y biopolímeros a partir de residuos del procesado de crustáceos, fácilmente aplicable a nivel industrial con un gasto reducido de reactivos en procesos altamente contaminantes, como la desacetilación de la quitina. Todos los materiales obtenidos son susceptibles de combinarse para el desarrollo de recubrimientos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana en consonancia al tipo de aplicación final que se desee.

Los quitosanos obtenidos presentan excelentes propiedades filmogénicas para el desarrollo de recubrimientos con propiedades activas y pueden actuar además como soporte de otros

materiales, lo que representa una amplia gama de aplicaciones. Además, por primera vez se desarrollan recubrimientos íntegramente en base a materiales recuperados a partir de residuos de langostino con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y que por vez primera, se utilizan para extender la vida útil de los langostinos.

Al mismo tiempo se ha conseguido aprovechar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales minimizando los cambios indeseables que su aplicación produce en las propiedades organolépticas de los alimentos, mediante el desarrollo de recubrimientos en bicapa. La incorporación de aceites esenciales en películas bicapa ofrece la posibilidad de controlar la liberación de compuestos activos sobre la superficie del alimento o bien de generar una atmósfera protectora alrededor del mismo cuando no está en contacto directo con él.

Igualmente y por primera vez se ha estudiado la aplicación agroindustrial de películas con propiedades insecticida, de fumigación y fungicida, concretamente frente a la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* y frente el hongo *Fusarium oxysporum*, con resultados prometedores. Estas películas son una barrera a la luz y al agua, mantienen sus propiedades bioactivas durante al menos 6 meses en condiciones ambientales y en humedad relativa controlada, que además son biodegradables una vez se desechan, lo que puede contribuir a mermar el impacto que generan los plásticos sobre el medio ambiente.

Bibliografía

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Armenta-López, R., Guerrero, I., & Huerta, S. (2002). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of food science*, 67(3), 1002-1006.
- De Holanda, H. D., & Netto, F. M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of food science*, 71(5), C298-C303.
- FAO. (1997). FAO Agriculture Series. In *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*.
- Gagne, N., & Simpson, B. (1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology*, 7(3), 253-263.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 809-812.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5750-5755.

- Giménez, B., Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M., Alemán, A., & Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1), 18-25.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78-85.
- Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- Khan, M., & Nowsad, A. (2013). Development of protein enriched shrimp crackers from shrimp shell wastes. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 10(2), 367-374.
- Kim, S.-K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*, 39(4), 383-393.
- Liñán-Cabello, M., Paniagua-Michel, J., & Hopkins, P. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 8(4), 299-309.
- Lodha, P., & Netravali, A. N. (2005). Effect of soy protein isolate resin modifications on their biodegradation in a compost medium. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 465-477.
- López-Caballero, M. E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2013). Valorization and Integral Use of Seafood By-Products. In *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, (pp. 367-412): CRC Press.
- López-Caballero, M. E., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M. d. C., & Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International journal of food science & technology*, 42(9), 1029-1038.
- Lora, J. H., & Glasser, W. G. (2002). Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, 10(1-2), 39-48.
- Mayes, S., Massawe, F. J., Alderson, P. G., Roberts, J. A., Azam-Ali, S. N., & Hermann, M. (2011). The potential for underutilized crops to improve security of food production. *Journal of Experimental Botany*.
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 163-172.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(18), 5598-5605.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 87-94.
- Rhim, J.-W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, 37(3), 323-330.

- Rhim, J.-W., Mohanty, K. A., Singh, S. P., & Ng, P. K. (2006). Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and poly (lactide). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3059-3066.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438-447.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 167-172.

XI. Extended abstract^[2]

[2] This extended abstract is included in fulfilment of the directives in the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, dated 28 of January, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC Nº14, dated 21st of December 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM

Introduction

Nowadays, there is great concern about the high amount of waste generated in the food industry. The need to reduce the use of plastic packaging materials derived from petroleum, with the subsequent environmental problem, has contributed to the development of packaging materials manufactured from naturally occurring raw materials which lowers the cost and reduces waste while putting to use the underutilized resources from the food processing industry and agriculture (Kosseva 2009, Mayes, Massawe *et al.*, 2011).

The use of these materials reduces the impact on the environment and facilitates sustainable management (FAO 1997), allows the development of packaging, films and coatings that can improve their physicochemical properties or even have an enhanced functional capacity by incorporating active compounds, which act as bioconservatives in foods.

Crustacean shell waste from the Industry are highly perishable, but they constitute an important source of proteins and bioactive peptides, minerals, lipids and pigments (Kim and Mendis 2006; Perez-Santin, Calvo *et al.*, 2013). At the same time, the accumulation of these materials represents a real environmental problem (Bhaskar, Sachindra *et al.*, 2005) and the final waste disposal is expensive for the industries. The major part of the crustacean are commercialized as whole individuals and thus, the generated residues represent domestic food wastes. In general, only the edible part is used (the muscle), which depending on the species, constitutes between 20-40% of the crustacean. The remainder represents the residue and waste (Khan and Nowsad 2013).

The development of efficient extraction methods that allow the maximum utilization of the generated waste could lead to the recovery of raw materials with interesting technological properties. The shellfish wastes are mainly used for chitosan extraction, an active material with filmogenic capacity (Gildberg and Stenberg 2001), but also can be a source of lipids, proteins and pigments (e.g., astaxanthin), (Gagne and Simpson 1993; Gildberg and Stenberg 2001; Armenta-López, Guerrero *et al.*, 2002; Holland and Netto 2006; Khan and Nowsad 2013). Some of these materials have active properties, as the chitosan antimicrobial activity or antioxidant properties, typical from carotenoid pigments and peptides, among other properties that are potentially useful for the food industry.

In addition to those active materials already mentioned, other biopolymeric materials from the aquaculture such as alginate and agar are abundant in nature. These compounds have been used

in countless applications widely referred to in the literature (López-Caballero, 2013) with a great many potential applications that have yet to be exploited. Furthermore, agricultural products such as soy, despite its abundance, is an underutilized species, so the possibility for new applications is a field of great interest. All the cited biopolymers have in common, among other properties, its filmogenic potential (Aider 2010; Rhim, Mohanty, Singh, Ng, 2006).

Among the bioactive materials, lignin and essential oils are of great interest. Lignin, an underutilized residue of the paper industry (Lora and Glasser 2002), contributes to food preservation by its light barrier and antioxidant properties (Nunez-flores, Giménez *et al.*, 2013). Regarding the essential oils, some of them have been successfully incorporated into the films not only to improve the physical properties (Oussalah, Caillet *et al.*, 2004; Gomez-Estaca, Bravo *et al.* 2009) but also to extend the shelf-life of food (Rojas-Grau, Soliva-Fortuny *et al.*, 2009). The search for the most appropriate essential oils, with greater antimicrobial activity and even insecticide properties would be of great interest and its choice will depend on the activity that you want to give or the intended use. The main drawback in the use of essential oils is the change that can be produced in the organoleptic properties of foods, hence the importance of developing new techniques for their incorporation and application on biodegradable films.

Considering the above, the design and development of films and coatings tailored to cover specific needs in the field of food and agriculture, is a real technological challenge.

Objectives

The aim of this Thesis was the design and development of films and coatings based on hydrocolloids and active compounds from underutilized resources and industrial wastes for their application in the agri-food sectors.

The achievement of this objective was carried out through the following partial objectives:

1. Valorization of industrial crustacean wastes and obtaining of polymeric and active material, mainly chitosan, proteins, lipids and carotenoids, through environmentally-friendly methods while maintaining their functionality.

2. Design and development of films and coatings based on materials recovered from crustacean wastes and characterization of their technological and active properties.
3. Application of chitosan-based coatings and protein-lipid rich extracts from crustacean wastes to seafood and aquaculture products during refrigerated storage.
4. Design and development of bilayer films based on agar and alginate with the incorporation of essential oils, characterization of their properties and application in food matrixes.
5. Design and development of bilayer films based on soy protein isolate, lignin and essential oils with insecticidal and fungicidal activity to be applied in agricultural crops, and evaluation of their stability and biodegradability.

Results

Recovery of active material from shrimp waste (*Litopenaeus vannamei*) and development of edible films and coatings

Initially, the shellfish waste of *L. vannamei* were used to obtain chitosan by two methods: shell deproteinization followed by chitin deacetylation, and directly by chemical deacetylation of the shells, avoiding the deproteinization stage (chitin isolation). Other process factors tested were the use of a reducing agent (NaBH_4) and deacetylation time (2 and 4 hours). Eight different types of chitosan were obtained according to the combinations of these factors. All the obtained chitosans had high deacetylation degree (DD, %), greater than 70%, and a molecular weight (Mw, kDa) which was increased through the use of the reducing agent and short times (2 h). The previous isolation of chitin, whose deacetylation traditionally takes place with caustic soda (NaOH) highly concentrated (40-50% w/v) at high temperatures (No and Meyers 1995; Muzzarelli and Peter 1997; Nessa, Masum *et al.*, 2010), was not necessary to obtain chitosan. The solubility and properties of the resulting chitosans were comparable to the commercial product. In this sense, the present work from the point of view of technological, economic and environmental issues is an improvement which had not been previously observed.

In addition to an efficient production of chitosan, it was raised a comprehensive integral utilization of wastes from aquaculture, since they are an excellent source of proteins, lipids and pigments. The extraction was proposed such that the recovered material could be used as an additive or ingredient for human consumption, this was the reason the use of chemical products was minimized. Through applying a moderate autolysis (40 °C, 4h), a sequence of extractions was carried out to obtain different phases rich in compounds of different nature that showed, at the same time, different biological properties: carotenoid-rich lipid extract (CE), lipoprotein extract (PC_c), a protein hydrolysate (HP_c) resulting from the PC_c hydrolysis using alcalasa and a chitinous residue which was added to the cuticle that remains insoluble. This insoluble fraction was centrifuged, resulting in a new lipoprotein-rich concentrate (PCw) and chitinous material, which was subjected to a demineralization process with lactic acid (75.6 g/l). The isolation of chitin was held by enzymatic hydrolysis in two stages using Viscozyme L and Alcalasa with a yield of 99.9%, which allows the obtaining of a protein hydrolysate (HP_{ch}). All the concentrates were characterized by the presence of an astaxanthin-rich carotenoprotein complex.

Chitin was used as starting material for chitosan isolation through an amendment to the method described above with a reduction of 20% by weight in the NaOH concentration during the deacetylation. This chitosan (Ch40) showed a deacetylation degree of 84%. Subsequently, by optimization of the deacetylation method, a reduction of 80% by weight in the NaOH concentration during the deacetylation resulted in chitosan (Ch10) with a deacetylation degree of 74%. This new chitosan isolation process through a combination of an enzymatic method and a chemical deacetylation with reduced consumption of reagents, and with the recovery of proteinaceous material, represents a great innovation that has not been referred in the literature; it is environmentally friendly as well as cost-effective technologically.

In order to study in depth the deacetylation process, another alternative for chitin deacetylation, was the application of a biological method with the use of crude enzyme extracts of chitin-deacetylase from *Mucor rouxii* and *Colletotrichum Lindemuthianum*. Chitin was depolymerized (to facilitate the enzyme action) by several chemical treatments (methanol and formic acid), but despite this, the process was not sufficiently effective to obtain highly soluble chitosan with a high deacetylation degree. To increase this deacetylation degree, the depolymerized chitin was previously subjected to a moderate treatment with NaOH (30% w/v), which allowed the enzyme to act more easily and improve the DD. Despite this, the deacetylation continued to be lower than

that obtained with 10% of NaOH (w/v), which is why this method was considered ineffective for chitosan isolation.

The different materials obtained were characterized to evaluate their filmogenic and bioactive capacity. First we studied the 8 chitosan obtained by the first methodology discussed. All of them showed antimicrobial activity as a filmogenic solution. The more sensitive microorganisms to the action of these chitosans were *Debaromyces hansenii* and *Bacillus coagulans*. The chitosans which showed a marked antimicrobial activity (ChQ4, ChR2, ChR4) were used to develop films at different drying times (12 and 24 h) which were conditioned at different relative humidity (58%, 75% and 90%). The higher the relative humidity and shorter the drying time of the films, the higher the antimicrobial activity. This fact could be attributed to the increase in water content and consequently the increase in active sites (protonated amino groups) which improve the chitosan antimicrobial activity.

Regarding the rheological properties, all the chitosans showed a Newtonian-like behavior, especially at low concentrations (1% w/w). However, at higher concentrations (3% w/w), and especially in the low molecular weight chitosans the values of the elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') were lower at low temperatures ($< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). On the contrary, high molecular weight chitosans, which represent the short deacetylation time, suffered a drastic increase in the G' values, a typical elastic-like behavior where $G' > G''$. In addition, the ChQ4 chitosan showed a high resistance of the material to elastic and viscous deformation at any tested temperature (5, 20, 40 °C), which makes it suitable to be used as a food coating. Despite the differences, the results indicate good filmogenic properties and film forming ability in all tested chitosans.

The chitosans obtained after the autolysis, during the integral utilization of shellfish wastes (Ch40 and Ch10), were selected as biopolymeric material for to developing into films and coatings. Furthermore, between the recovered active materials, the lipoprotein-rich concentrate PCc and the carotenoid-rich lipid extract CE were selected to be incorporated into film-forming formulations because of their bioactive properties. Both in filmogenic solution or film and coating, the addition of PCc considerably increased the antioxidant properties (FRAP and ABTS) due to the presence of astaxanthin (Liñan-Cabello, Paniagua-Michel *et al.*, 2002). The antimicrobial properties against 26 selected microorganisms (pathogens, spoilers and lactic bacteria) were also improved, probably due to the effect of the lipoprotein-rich concentrate, which is positively charged at acidic pH, and by the presence of antimicrobial peptides produced during the extraction of the PCc

concentrate. In terms of the physicochemical properties, the films developed with chitosan Ch10 with the incorporation of PCc showed good light-barrier properties. In addition, the presence of PCc provided greater rigidity to the films, probably due to a partial aggregation and the lipid content of PCc that could contribute to an emulsion in the polymeric matrix which confers greater insolubility to the film.

Application of edible coatings in shrimp (prawns)

Due to the good results in terms of filmogenic and active properties, even as film or coating, these active materials were used together in a coating formulation (CH10 + PCc) and applied to whole raw prawns. The objective was to study their effect during refrigerated storage. The presence of PCc in the coating decreased the viscosity considerably of the filmogenic solution, but was still adequate to adhere and reduce the microflora during refrigerated storage. The PCc coating was especially effective even after 10 days of the conservation trial against microorganisms, mainly H₂S producer's organisms, *Shewanella putrefaciens*, and other microorganisms involved in the spoilage of fish (Lopez-Caballero, Martinez-Alvarez *et al.*, 2007). Also, the NBVT levels did not increase significantly, which is attributed to the beneficial joint effect between chitosan and PCc. This effect was also manifested at the sensory level, since the coating delayed the appearance of melanosis, while the characteristic chitosan astringency was masked during the sensory evaluation.

Development of bilayer films incorporated with essential oils applied on food

With the aim of avoiding the changes produced by essential oils (EO) in the sensory properties when applied on foods, some polymeric matrixes and several methods of incorporation of the EO into the films were assayed in order to maximize their active properties.

Essential oils have many biological properties that, together with their natural origin, make them high-value compounds. Of the EO with demonstrated antimicrobial activity, the cinnamon EO was selected to be incorporated in edible coatings due to its mild and delicate flavor. One of the technological challenges encountered was to find an adequate dosage to achieve the desired effect without altering the organoleptic properties of foods. In addition, the resultant product had to be suitable and convenient to avoid consumer rejection. To formulate these films, some biopolymers that allow the controlled release of bioactive compounds were chosen, such as agar and alginate. Then, a bilayer film was designed, in which the active compound was incorporated in the outer layer of each matrix (agar or alginate), exposed to the air. These bilayer films were

applied on raw prawns to assess their effect during refrigerated storage. Sensory evaluation reveals that the bilayer films protect the food from flavors and odors from the essential oil. The bilayer films were clear, transparent, and stable. The layers did not separate and did not lose integrity while maintaining its appearance. The bilayer films also showed antioxidant and antimicrobial properties that are directly associated with the presence of cinnamaldehyde and eugenol, the majority compounds from the cinnamon EO responsible in a large extent for these activities (Gill and Holley 2004). The release of these active compounds reached the maximum at 9 h in both agar and alginate films. However, the release of these compounds from the matrixes was maintained even after 72 h both in cooling and at ambient temperature. This release was more controlled than that observed in other matrixes. The release of eugenol from gelatin films was just in 45 min, which decreases at 16 h. In the present study, the release of active compounds is gradual and controlled, accordingly with the antioxidant capacity (by ABTS as by FRAP) obtained for the agar and alginate films.

Regarding the antimicrobial activity, the agar bilayer films inhibited in a greater extent the microbial growth compared to the alginate bilayer films in *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella choleraesuis*, *Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. The differences in the antimicrobial activity could be related to the type of matrix used and a lesser or greater degree of interaction of the matrix with the EO.

The bilayer films with antimicrobial and antioxidant capacity were applied on the surface of raw peeled prawns (*L. vannamei*) previously inoculated with *L. monocytogenes* to evaluate their effect against this pathogen and natural microflora during refrigerated storage. The results showed that after 7 days of storage, *L. monocytogenes* counts decrease 3 logarithmic cycles when the bilayer films were applied this effect being slightly higher in alginate films. The counts increase in 4 logarithmic cycles in the control (without EO). The use of bilayer films opens a wide variety of interesting applications of essential oils in food preservation, since these bilayer films protect food from spoilage and at the same time minimize the changes in the sensory properties.

Development of bilayer films with essential oils for application in agriculture

In order to develop films with demonstrated insecticidal properties for agro-industrial use, clove and citronella essential oils were selected. These EO were incorporated into several polymeric

materials to allow the development of a biodegradable, excellent water and light barrier matrix, which tends to be the major weakness of films made with biopolymers.

The selection of the polymeric materials was made by taking into account their filmogenic ability, low commercial value, and suitability as agroindustrial and potentially recyclable substrate. The materials selected were soy protein isolate (SPI) and lignin, both of them are underutilized resources. Films were developed by the bilayer technique, with the incorporation of the EO (clove or citronella) in the outer layer to minimize changes at sensory level and on the basis of the good results obtained, as referred previously. The SPI was cross-linked with formaldehyde to confer greater resistance and insolubility to the polymeric matrix. The lignin gave the film light protection and the EO provided the biological properties required of the bilayer film.

These films showed insecticidal properties against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*, responsible for the attacks on plantations and crops causing great economic impact. During the bioassay, after 30 min of film exposure, the clove EO increased the flies mortality (~90%) compared to the citronella EO (~10%). The area of the film used during the bioassay was critical, in particular with clove EO, since the greater the film area, the greater the insecticidal activity. In the case of citronella EO, this effect was minimal, which may be associated with a minor release of the active compounds from the film matrix. In general, when an active compound is incorporated into a film, its activity could be reduced compared with the activity by itself, since the compound often interacts with the matrix in which it is incorporated (Gomez-Estaca, Bravo *et al.*, 2009; Gomez-Estaca, Giménez *et al.*, 2009). The development of films with insecticidal and repellent activity means an innovative and active packaging with potential application in the field of Agronomy.

In this sense, and in an attempt to simulate the conditions endured by the plastic bags during crop protection, a cross-linked SPI-lignin bilayer film incorporated with citronella EO was selected. These films were stored under environmental or controlled (58% of RH, 21 °C) conditions for 1, 3 and 6 months in order to evaluate their ability to release active compounds (citronellal and geraniol) and the stability at external environmental factors such as water, dehydration, and their potential soil biodegradation once they are discarded. The results show that the films were an excellent water barrier (probably by the crosslinking with formaldehyde), kept the integrity, the layers were not separated and films were an optimum light barrier attribute due to the presence of lignin (Nunez-flores, Giménez *et al.*, 2013) In addition, the release of citronellal and geraniol was greater in the films stored at 58% HR and 21 °C, than in those maintained under atmospheric conditions. During

this period, the aggregation of the SPI increases with time. After six months, a drastic decrease in the concentration of EO in the films occurred. These results are mainly related to the evaporation of the active compounds from the polymeric matrix by the exposure to environmental factors. Despite this, all the stored films showed antimicrobial activity against the fungus *Fusarium oxysporum*, which is the microorganism responsible for "Panama disease", which irreversibly affects the banana plantations and generates huge economic losses to the Industry.

Given the excellent results obtained, a storage trial was performed with the aim of assessing the effect of the bilayer films on the Canarian banana (*Musa acuminata* Colla AAA). The bilayer films with and without citronella essential oil were micro-perforated and used to cover bananas like a bag (leaving a free space to prevent the direct contact between the bag and the fruit) and stored at 15 °C for 6 days. During the storage, a decline in the microbiota of bananas by effect of the films (with or without EO) was observed, and this decrease was higher in the presence of the essential oil. Probably the films generated an antimicrobial atmosphere by the presence and release of active volatile compounds in the vapor phase from the EO (Goñi *et al.*, 2009). The use of these films did not produce changes in the organoleptic properties since the panel was not able to discriminate between treatments.

Commercial polymers and especially synthetic polymer products and petroleum plastics reflect a great lack of scarcely or null degradability. This fact makes especially interesting the biopolymeric matrixes, although these materials reflect a general lack of versatility compared to the conventional plastics. The films stored under controlled conditions (58% HR and 21° C) by 1, 3 and 6 months were subjected to a biodegradation test. Throughout the 1 month of the assay, it was observed that all films, regardless of the time and the conditions in which they were kept, showed a weight loss of about 30% in one month once they were placed on the ground. This degradation was much faster compared to the degradation of the conventional synthetic polymers and can be associated with the loss of soluble compounds such as glycerol, weak cross-linked protein, microbial activity and enzymatic degradation by being in contact with the ground. These changes have been previously described during the degradation test of soy protein films without crosslinking (Lodha and Netravali 2005). The results obtained in terms of release of active compounds, biological activities (antioxidant, insecticide, antimicrobial, among others) and biodegradability of the developed films, are an alternative that opens up the possibility of countering the current pollution problem.

Conclusions

1. The comprehensive utilization of the shellfish waste resulted in obtaining high-value functional materials such as chitosan, concentrates, and hydrolysates of lipoprotein nature and carotenoids.
2. The isolation of chitosan from crustacean cuticles was optimized by employing a soft chemical process and made more environmentally friendly with a total protein recovery (which represents 41% of the cuticle) through a deproteinization with alcalase and viscozyme, and a deacetylation with a reduction of the NaOH concentration from 12.5 M to 2.5 M (80% by weight).
3. The various extraction processes resulted in chitosan noted for filmogenic and antimicrobial capacity. The active materials rich in protein, lipids and carotenoids are versatile additives in the formulation of chitosan-based coatings, maintaining and even improving their antioxidant and antimicrobial activity, even in filmogenic solution as in films and coatings.
4. The coating developed with the chitosan, isolated by the soft chemical process and the incorporation of the lipoprotein-rich concentrate, improves the microbiological quality, delays the onset of melanosis, is not sensorially detected, and increases by 30% the shelf-life in prawns during refrigerated storage.
5. The development of bilayer films with agar and alginate allows the diffusion of antioxidant and antimicrobial compounds from cinnamon essential oils into the food, reducing the changes of their sensory properties and inhibits *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in prawns during refrigerated storage.
6. The cross-linked soy protein isolate and lignin bilayer films enriched with clove or citronella essential oil allows the diffusion of bioactive volatile compounds from the essential oils which exert a repellent effect and a noticeable insecticidal activity with the clove essential oil, against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*.
7. The soy protein isolate and lignin bilayer films enriched with citronella essential oil inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* and maintains their activity over six months of storage both exposed to controlled environmental conditions (58 % RH, 21 ° C), and are excellent

water and light barriers that does not modify the organoleptic properties when are applied on bananas (*Musa acuminata* Colla AAA) and are biodegradable in the environment in 30 days.

General conclusion

The selected strategy for the design and development of active mono or bilayer films and coatings depends on the biopolymer, active material and their final purpose which diversify their functionality and application. This strategy allows the use of underutilized resources or industrial wastes with filmogenic capacity, antioxidant, antimicrobial and insecticidal activity, which does not modify the organoleptic properties of food and are highly biodegradable once are discarded.

Key contributions of the Thesis

The present Thesis proposes new methods for the development of films and coatings, both with the obtaining of biopolymers and active materials or giving new alternatives for the use of underutilized resources. The developed and improved extraction methods have been designed from an environmental point of view, so they are more soft and eco-friendly. With these methods were obtained materials with functional properties which exert their active properties even when they are used as ingredients within a formulation.

The present study also proposes obtaining active materials and biopolymers from crustacean residues, easily applicable at an industrial level with the minimum expenditure of reagents in processes that are usually highly polluting, such as the chitin deacetylation. All the obtained materials were combined to develop films and coatings with antioxidant and/or antimicrobial activity in accordance with the type of application and the final use.

These chitosans have excellent filmogenic properties to be used for the development of films and coatings with active properties and can also act as a support for other active materials, with a wide range of applications. For the first time, films and coatings entirely based on materials recovered from crustacean waste with antioxidant and antimicrobial properties were developed. These films and coatings were used to extend the shelf life of prawns.

Considering the antimicrobial and antioxidant properties of essential oils, bilayer films have been developed. This system minimizes undesirable changes in the organoleptic properties of the food

that could cause the EO. The incorporation of essential oils in bilayer films offers the possibility to control the release of active compounds on the food surface, or through a protective atmosphere with volatile active compounds around it when it is not in direct contact with the food.

These results are an original contribution, setting out for the first time an agroindustrial application of films with insecticidal, fumigant and fungicidal properties, specifically against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* and the fungus *Fusarium oxysporum*, with promising results. These films are a barrier to light and water and maintain their bioactive properties for at least 6 months in both environmental and controlled conditions. These films are also biodegradable once discarded, which can contribute to minimizing the impact generated by plastics on the environment.

References

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Armenta-López, R., Guerrero, I., & Huerta, S. (2002). Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of food science*, 67(3), 1002-1006.
- De Holanda, H. D., & Netto, F. M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of food science*, 71(5), C298-C303.
- FAO. (1997). FAO Agriculture Series. In *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*.
- Gagne, N., & Simpson, B. (1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology*, 7(3), 253-263.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 809-812.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5750-5755.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.

- Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M., Alemán, A., & Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1), 18-25.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78-85.
- Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- Khan, M., & Nowsad, A. (2013). Development of protein enriched shrimp crackers from shrimp shell wastes. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 10(2), 367-374.
- Kim, S.-K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*, 39(4), 383-393.
- Liñán-Cabello, M., Paniagua-Michel, J., & Hopkins, P. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition*, 8(4), 299-309.
- Lodha, P., & Netravali, A. N. (2005). Effect of soy protein isolate resin modifications on their biodegradation in a compost medium. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 465-477.
- López-Caballero, M. E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2013). Valorization and Integral Use of Seafood By-Products. In *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, (pp. 367-412): CRC Press.
- López-Caballero, M. E., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M. d. C., & Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International journal of food science & technology*, 42(9), 1029-1038.
- Lora, J. H., & Glasser, W. G. (2002). Recent industrial applications of lignin: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, 10(1-2), 39-48.
- Mayes, S., Massawe, F. J., Alderson, P. G., Roberts, J. A., Azam-Ali, S. N., & Hermann, M. (2011). The potential for underutilized crops to improve security of food production. *Journal of Experimental Botany*.

- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 163-172.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(18), 5598-5605.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 87-94.
- Rhim, J.-W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, 37(3), 323-330.
- Rhim, J.-W., Mohanty, K. A., Singh, S. P., & Ng, P. K. (2006). Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein isolate and poly (lactide). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3059-3066.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438-447.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 167-172.